(Physiologisches Laboratorium in Bonn.)

Meine Methode der quantitativen Analyse des Glykogenes und die Arteigenthümlichkeit der Substanzen des Thierleibes.

Von

Eduard Pflüger.

Emil Abderhalden forderte mich vor einiger Zeit auf, die quantitative Analyse des Glykogenes für sein „Handbuch der „biochemischen Arbeitsmethoden“ zu bearbeiten. Ich lehnte ab, weil meine Vorarbeiten zur Verbesserung der Glykogenanalyse noch nicht zum Abschluss gelangt waren. Wie ich soeben sehe, hat Dr. Karl Grube die Arbeit übernommen und in dem zweiten Bande von E. Abderhalden's Handbuch der biochemischen Arbeitsmethoden S. 159, ohne dass ich eine Ahnung davon hatte, veröffentlicht. Da Dr. Karl Grube mehrere Jahre unter meiner Leitung in meinem Laboratorium über den Stoffwechsel der Kohlehydrate gearbeitet hat, so wird wohl vielfach vorausgesetzt werden, dass ich mit seiner Darstellung des Gegenstandes einverstanden sei. Gegen solche Voraussetzung muss ich mich verwahren! Dr. Karl Grube hat nicht einmal die wichtigen neueren Arbeiten über Glykogenanalyse, die in meinem Laboratorium ausgeführt und in diesem Archive veröffentlicht worden sind, berücksichtigt. Ich bin deshalb gezwungen, eher als es in meinem ursprünglichen Plane lag, hier eine kurze Bearbeitung meiner Methode der Glykogenanalyse zu veröffentlichen.

Die erste und wichtigste Thatsache zur Beurtheilung der in Betracht kommenden analytischen Methoden ist die Unangreifbarkeit des Glykogenes durch Kalilauge. Dieses Reagens ermöglicht deshalb die Gewinnung des Glykogenes aus den Organen des Thierleibes, weil sie diese in Lösung überführt, also das Glykogen aufschliesst, so dass es dann mit Alkohol gefällt werden kann.

Mit der Unangreifbarkeit des Glykogenes durch Kalilauge hat es aber eine besondere Bewandniss. Denn wenn auch schon Claude

Bernard¹⁾ und August Kekule²⁾ an diese Unangreifbarkeit glaubten, ergaben doch die Untersuchungen späterer Forscher, wie v. Vintschgau und Dietl³⁾, R. Külz⁴⁾ und mir selbst⁵⁾, dass sogar verdünnte Kalilauge von 1 bis 2% das Glykogen zu zersetzen scheint. Dr. Josef Nerking⁶⁾ gelangte sogar zu dem Ergebniss, dass die Anwendung der Kalilauge bei der Glykogenanalyse aufzugeben sei. Denn nach seiner auf zahlreiche Analysen gegründeten Ansicht „wird durch den Einfluss der Kalilauge fortwährend neues „Glykogen aufgeschlossen oder abgespalten, gleichzeitig aber auch „schon gebildetes Glykogen durch die Kalilauge zerstört“. Beiläufig sei hier daran erinnert, dass durch die Untersuchungen von E. Pflüger⁷⁾ und H. Löschke⁸⁾ die Angaben Nerking's widerlegt sind. Denn alles Glykogen lässt sich ohne Kali und nur durch siedendes Wasser den Organen entziehen, so dass keine Berechtigung zu der Annahme vorliegt, dass das Glykogen in den Organen chemisch gebunden sei und erst durch Kalilauge abgespalten werde.

Eine ausserordentliche Schwierigkeit für das Verständniss der Kaliwirkung entstand aber, als ich sicher nachwies, dass Glykogen durch **sehr starke** Kalilauge bei monatelang fortgesetztem Kochen in keiner Weise angegriffen werde. Und doch hatte ich⁹⁾ selbst in Uebereinstimmung mit v. Vintschgau und Dietl wie mit dem sehr exakten Arbeiter R. Külz ebenfalls Verluste beim Kochen von Glykogen mit **verdünnter** Kalilauge zugeben müssen.

Um eine Aufklärung der Paradoxie zu erlangen, dachte ich an die durch F. W. Pavy¹⁰⁾ betonte Thatsache, dass das nach der Methode von Brücke-Külz dargestellte Glykogen durch die Salzsäure und das Kaliumquecksilberjodid und weitere Reinigung eine Veränderung erfährt, die es für Kalilauge angreifbar macht. Die dabei entstehenden Dextrine sollen sich durch diese Eigenthümlich-

1) Claude Bernard, *Leçons sur la Physiologie et la Pathologie du Système Nerveux* t. 1 p. 467.

2) August Kekule, *Pharmaceutisches Centralblatt* 1858 S. 300.

3) v. Vintschgau und Dietl, *Pflüger's Archiv* Bd. 13 S. 253. 1876.

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

5) E. Pflüger, *dieses Archiv* Bd. 75 S. 164. 1899.

6) J. Nerking, *Pflüger's Archiv* Bd. 81 S. 39.

7) und 8) H. Löschke, *Pflüger's Archiv* Bd. 102.

9) E. Pflüger, *Glykogen* S. 85. Bonn 1905.

10) F. W. Pavy, *The Physiology of the Carbohydrates. An Epicriticism* p. 38. London 1895.

keit auszeichnen. Ich stellte deshalb jetzt das Glykogen auf die schonendste Weise dar, indem ich es nur mit Wasser aus dem neutralisierten Organbrei oder auf andere Weise mit Ausschluss von Säuren und den Brücke'schen Reagentien auszog. Jetzt erwies sich dieses Glykogen als viel widerstandsfähiger, so dass der beim Kochen in verdünnter Kalilauge auftretende Verlust fast in die Beobachtungsfehler fiel, ja zuweilen ganz fehlte.

Ich musste also in Betracht ziehen, ob nicht das von mir auf das Sorgfältigste aus den Organen zu den Versuchen isolirte Glykogen doch eine Veränderung erfahren habe. Bereits in meinem grossen Werke über das Glykogen sagte ich: „Ich kann also mit „Sicherheit den vollkommenen Ausschluss von Fermentbildungen „nicht behaupten.“ Ich wollte damit sagen, dass das von mir auf das Sorgfältigste dargestellte Glykogen vielleicht doch eine Schädigung erfahren habe und nicht mehr identisch mit dem primär in den Organen enthaltenen Glykogen sei.

Da kam mir der richtige Gedanke, den frischen Organbrei in verdünnter Kalilauge beliebig lange zu kochen, aber zuletzt den Kaligehalt stark zu steigern und weiter zu kochen. Da sich nun herausstellte, dass derselbe Werth für das Glykogen erhalten wird, als wenn man gleich von Anfang an mit concentrirter Kalilauge erhitzt hätte, so ist bewiesen, dass die verdünnte Kalilauge das in den Organen befindliche Glykogen in keiner Weise versehrt. Diese wichtige Thatsache ist in einer grossen, unter meiner Leitung ausgeführten Untersuchung von Dr. Georg Francke festgestellt und in seiner Inauguraldissertation zur Erlangung der Doctorwürde der hohen veterinär-medicinischen Facultät der Universität zu Bern genauer beschrieben. Demnach gilt der Satz: **Glykogen kann mit Kalilauge beliebiger Concentration beliebig lange gekocht werden, ohne dass es eine Spur von Zersetzung erfährt.**

Da die wichtige Arbeit von Georg Francke¹⁾ sogar den Specialisten unbekannt geblieben ist, wird es zweckmässig sein, wenn ich die thatsächliche Begründung des Hauptergebnisses durch Wiederabdruck von wenigstens 2 Versuchsreihen hier mittheile.

1) Georg Francke, kgl. Kreisthierarzt in Cöln a. Rh., Ueber die Ursache, weshalb die Glykogenanalyse bei Anwendung verdünnter Kalilauge zu niedrige Werthe geliefert hat. — Bernhard Schöndorff, Peter Junkersdorf und Georg Francke, Ueber die Ursache der Fehlbeträge in der Glykogenanalyse bei Anwendung verdünnter Kalilauge. Dieses Archiv Bd. 127 S. 274. 1909.

Versuchsreihe mit Hundeleber. Doppelversuch¹⁾.

Nummer des Versuchs	Concentration der Kalilauge	Kochdauer in Stunden	Procentgehalt an Glykogen	Mittelwerthe des Procentgehaltes	Bemerkungen
C	30 %	3	16,197	} 16,319	
D	30 %	3	16,441		
7	1 %	24 + 1	16,686	} 16,442	Nach 24stündigem Kochen auf 30 % KOH gebracht und noch 1 Stunde gekocht.
8	1 %	24 + 1	16,197		
9	1 %	48 + 1	16,375	} 16,408	Nach 48stündigem Kochen auf 30 % KOH gebracht und noch 1 Stunde gekocht.
10	1 %	48 + 1	16,441		
11	1 %	72 + 1	16,686	} 16,442	Nach 72stündigem Kochen auf 30 % KOH gebracht und noch 1 Stunde gekocht.
12	1 %	72 + 1	16,197		

Der Doppelversuch, der aus 6 Einzelversuchen besteht, ist so angestellt, dass die 1004,6 g wiegende Leber eines 12,7 kg schweren Hundes benutzt wurde, der auf Glykogen gemästet worden war. Von derselben Leber konnten also, nachdem sie wohlzerkleinert und gemischt war, für jeden der 6 Versuche je 50 g Brei verwandt werden.

Versuchsreihe mit Hundemuskel. Doppelversuche²⁾.

Nummer des Versuchs	Concentration der Kalilauge	Kochdauer in Stunden	Procentgehalt an Glykogen	Mittelwerthe des Procentgehaltes	Bemerkungen
G	30 %	3	2,034	} 2,041	
H	30 %	3	2,048		
23	1 %	24 + 1	2,034	} 2,0699	Nach 24stündigem Kochen auf 30 % KOH gebracht und noch 1 Stunde gekocht.
24	1 %	24 + 1	2,106		
25	1 %	48 + 1	2,106	2,106	Nach 48stündigem Kochen wie Nr. 23 und 24 behandelt.
26	1 %	72 + 1	2,1105	} 2,030	Nach 72stündigem Kochen auf 30 % KOH gebracht und noch 1 Stunde gekocht.
27	1 %	72 + 1	1,9499		

1) Dieses Archiv Bd. 127 S. 276.

2) Dieses Archiv Bd. 127 S. 277.

Es kann also kein Zweifel sein, dass diejenige Art des Glykogenes, welches primär in den Organen enthalten ist, durch verdünnte Kalilauge nicht angegriffen wird.

Dr. Karl Grube sagt aber in seiner soeben erst erschienenen Abhandlung vom Glykogen:

„Mit starker Kalilauge kann es gekocht werden, ohne dass es „sich zersetzt, durch schwache wird es angegriffen.“

Will man sich Rechenschaft ablegen über die Ursache, weshalb bei Anwendung verdünnter Kalilauge auf Glykogen grössere Verluste bisher beobachtet worden sind als beim Erhitzen mit concentrirter Kalilauge, so kommen wesentlich zwei Umstände in Betracht.

1. Wenn das Organ durch Kochen mit verdünnter Lauge in Lösung gebracht wurde, ist die Denaturirung des Eiweisses nicht weit genug vorgeschritten. Es sind also noch viele Eiweissflocken da, welche Glykogen einschliessen, so dass es nicht ausgewaschen werden kann. — Bei Kochen mit concentrirter Lauge ist das Eiweiss denaturirt, so dass eine viel kleinere Menge von kleineren Flocken erhalten worden ist, die kein Glykogen mehr einschliessen. — Ich habe ja quantitativ nachgewiesen, dass bei der Methode von Külz nach Anwendung der **verdünnten** Kalilauge oft ungeheuer grosse Glykogenmengen¹⁾ so in den Eiweissniederschlag eingebacken sind, dass sie nicht ausgewaschen werden können.

2. Die zweite Ursache zu Glykogenverlust hat ihren Grund darin, dass das Glykogen, wenn es aus dem Organe isolirt worden ist, durch die zur Isolation verwandte chemische Behandlung oder auch durch einwirkende Fermente eine Veränderung erfahren hat.

3. Nicht ausreichend aufgeklärt ist meine sonderbare Beobachtung, dass das angreifbar gewordene Glykogen bei Behandlung mit concentrirter Kalilauge sich als resistent erweist. Ich beabsichtige diesen paradoxen Punkt nochmals eingehend zu prüfen. —

Nachdem festgestellt war, dass thatsächlich die Ausbeute an Glykogen immer zu klein ausfällt, wenn verdünnte Kalilauge zur Aufschliessung der Organe aufgewandt wird, war es notwendig festzustellen, wie gross die Concentration der Kalilauge sein muss, um richtige Werthe zu erhalten. Mit dieser Untersuchung habe ich Herrn Paul Heyden beauftragt, welcher dieselbe unter meiner

1) E. Pflüger, Glykogen S. 39. Bonn 1905.

Leitung in meinem Laboratorium bearbeitet und in seiner Inauguraldissertation¹⁾ veröffentlicht hat.

Bei der Vergleichung der Wirkung der 30 %igen und 2 %igen Lauge ergab sich ein sofort in die Augen springender grosser Fehlbetrag bei Anwendung der verdünnten Lauge.

Auffallend erscheint es aber, dass bei Vergleichung der 30 % Kalilauge mit der von 15 % oder 7,5 %, zwar auch noch die reichere Ausbeute bei 30 % sicher heraustritt, aber doch ist der Unterschied meist kleiner, ja fehlt ganz.

Da ein Unterschied aber auch bei Vergleichung von 30 %iger mit 15 %iger Kalilauge in gedachter Richtung noch deutlich bemerkbar bleibt, folgt, dass die richtige Stärke der Kalilauge 30 % beträgt.

Es blieb nun noch die Frage zu erörtern, wie lange die Organe mit 30 %iger Kalilauge gekocht werden müssen, um die vollständige Zerstörung der Eiweissstoffe zu erzielen. Diese Aufgabe zu behandeln habe ich Herrn Victor Hessen²⁾ übergeben, der seine Ergebnisse, die er unter meiner Leitung in meinem Laboratorium erhielt, in seiner Inauguraldissertation veröffentlicht hat.

Es geht aus diesen Versuchen hervor, dass man dieselben Glykogenwerthe erhält, wenn man die Organe $\frac{1}{2}$, 1, 2 oder 3 Stunden mit 30 % Kalilauge kocht; eine halbstündige Kochdauer genügt also, wenn man nur dafür Sorge trägt, dass der Kolben alle 5 bis 10 Minuten aus dem Wasserbade herausgenommen und geschüttelt wird.

Die Begründung folgt aus diesen Tabellen:

1) Paul Heyden, prakt. Thierarzt in Hermülheim bei Cöln a. Rh., Ueber den Einfluss, den die Concentration der Kalilauge auf die quantitative Analyse des Glykogenes ausübt. Der veterinär-medicinischen Facultät in Giessen vorgelegt. Dasselbe kürzer abgefasst von Bernhard Schöndorff, Peter Junkersdorf, Paul Heyden. Dieses Archiv Bd. 126 S. 582. 1909.

2) Victor Hessen, städtischer Thierarzt in Barmen, Ueber den Einfluss, den die Zeit der Erhitzung mit starker Kalilauge auf die quantitative Analyse des Glykogenes ausübt. Der hohen veterinär-medicinischen Facultät der Universität Bern vorgelegt. 1909. — Dasselbe in abgekürzter Form von Bernhard Schöndorff, Peter Junkersdorf, Victor Hessen. Dieses Archiv Bd. 126 S. 578. 1909.

Tabelle.

Nummer der Ver- suchsreihe	Untersuchtes Organ	Mittelwerthe des Glykogengehaltes in Procenten nach Kochdauer in Stunden:			
		3	2	1	1/2
I	Muskel	0,3169	—	0,3223	—
II	"	0,885	—	0,8775	—
III	"	0,934	0,923	0,92	—
IV	"	1,185	1,212	1,232	1,185
V	Leber	13,568	13,282	13,428	13,401
VI	Muskel	2,4075	2,458	2,4198	2,4708
VII	Leber	17,7628	—	17,8339	17,6914
VIII	Muskel	3,897	—	3,85	3,897

Tabelle.

	Kochdauer 3 Stunden	Kochdauer 1 Stunde
Mittel aus den Muskelwerthen von Versuchs- reihen I, II, III, IV, VI und VIII	1,6209 %	1,6036 %
Mittel aus den Leberwerthen von Versuchsreihe V und VII	15,6654 %	15,6808 %
	Kochdauer 3 Stunden	Kochdauer 2 Stunden
Mittel aus den Muskelwerthen von Versuchs- reihe III, IV, VI	1,5088 %	1,564 %
	Kochdauer 3 Stunden	Kochdauer 1/2 Stunde
Mittel aus den Muskelwerthen von Versuchs- reihe IV, VI, VIII	2,4965 %	2,5176 %
Mittel aus den Leberwerthen von Versuchsreihe V und VII	15,6636 %	15,546 %

Weil aber das häufige Herausnehmen des Kolbens aus dem siedenden Wasserbad äusserst lästig ist, verfahren wir gewöhnlich so, dass wir dies nur im Anfange ein- oder zweimal vollziehen, jedesmal gut schütteln und dann 2 Stunden erhitzen. Das hat auch den grossen Vortheil, dass die ausreichende Zerstörung der Gewebe selbst dann sicher erzielt wird, wenn es sich um die Aufschliessung der Organe sehr alter Thiere handelt. Es ist z. B. sehr auffallend

und von mir oft beobachtet, dass besonders bei Anwendung verdünnter Kalilauge die Lösung der Organe sich in ausserordentlicher Weise verzögert, wenn es sich um sehr alte Thiere handelt.

Demgemäss verfähre ich nunmehr so: 100 g mit der Fleischhackmaschine zerkleinertes Organ wird eingetragen in einen Kolben, welcher bereits 100 ccm Kalilauge von 60 % enthält und schon längere Zeit im siedenden Wasserbad auf 100° C. erhitzt worden ist. Hierdurch wird die im Organbrei sich vollziehende Fermentation sofort unterbrochen. Nachdem der Kolben 10 Minuten im siedenden Bad war, wird er herausgehoben, geschüttelt und dann wieder in das siedende Bad zurückgebracht. Das wird dann 20 Minuten nach Beginn der Erhitzung wiederholt. — Sobald die Erhitzung 2 Stunden gedauert hat, wird der Kolben aus dem Wasserbad gehoben, unter der Pumpe durch einen continuirlichen Wasserstrahl abgekühlt und in ein Becherglas entleert. Mit 200 ccm Wasser wird der Kolben rein gespült, so dass die Lösung auf ungefähr 400 ccm gebracht wird, die man dann mit 800 ccm Alkohol von 96 % Tr. versetzt, gut umrührt und über Nacht mit einem Uhrglas verschlossen hinstellt, damit sich das Glykogen gut absetze.

Von dem grossen Becherglas wird nun die über dem Niederschlag stehende Flüssigkeit in ein zweites geräumiges Becherglas abgegossen und sofort mit Hilfe eines sehr grossen mit Hahn versehenen Trichters durch ein gutes Faltenfilter abfiltrirt. —

Der Glykogenniederschlag wird auf ein zweites schwedisches Filter gebracht, welcher einen Durchmesser von 15 cm besitzt. Dieser Niederschlag wird mit 66 % igem Alkohol so lange gewaschen, bis das Filtrat nahezu farblos abläuft. Dann folgt Waschung mit Alkohol absolutus, dann mit Aether und zuletzt nochmals mit absolutem Alkohol.

Das Faltenfilter, welches die decantirte Flüssigkeit aufgenommen hatte, wird nur mit 66 % igem Alkohol gewaschen.

Es handelt sich jetzt darum, das Glykogen zu trennen von den Flocken und Farbstoffen, die es noch verunreinigen. Ich nehme das feuchte schwedische Filter vom Trichter, entfalte dasselbe über einem geräumigen Becherglas von ca. 300 bis 500 ccm Gehalt und

streiche mit einem Platinspatel die ganze Schmiere vom Papiere ab, so dass sie in das Becherglas fällt. Dann bringe ich das Filter wieder auf den Trichter und befestige das Faltenfilter über das Filter, von dem das Glykogen abgewischt wurde. Es stehen also zwei Filter übereinander. Nunmehr giesse ich siedendes Wasser auf das Faltenfilter, so dass das Filtrat das untere Filter füllt und die noch anhaftenden Glykogenspuren löst, was man durch ein Pinselchen befördert. So erhält man das ganze Glykogen mit seinen Verunreinigungen in das Bechergläschen. Durch längeres Umrühren bringt man das Glykogen in Lösung und filtriert dann durch Glaswolle in ein geaichtes Kölbchen von 100 bis 200 bis 500 bis 1000 ccm Gehalt. Meist genügt ein Kölbchen von 200 ccm. Sind grössere Glykogenmengen vorhanden, muss man geräumigere Kolben verwenden. Die trübe schmutzige Lösung wird nun in dem noch nicht ganz aufgefüllten Kölbchen abgekühlt und mit ein wenig Salzsäure von 1,19 spec. Gew. versetzt. Man tröpfelt vorsichtig zu, bis sich deutliche Flöckchen ausscheiden, welche durch klare Flüssigkeit geschieden sind. Gewöhnlich gebraucht man 0,5 bis 1 bis 2 ccm bei Untersuchung von 100 g Organ. Giesst man zu viel oder zu wenig Salzsäure zu, so erhält man kein klares Filtrat. Man muss hier langsam mit grosser Vorsicht die kleinen Zusätze machen. Glaubt man die richtige Fällung erzielt zu haben, so füllt man das Kölbchen auf bis zur Marke, giesst in ein Becherglas aus und wartet einige Zeit, bis die meist stark gefärbten Flocken sich gesenkt haben. Dann filtrirt man entweder durch ein schwedisches Filter oder durch „Blauband“ Nr. 589 aus der Fabrik von Schleicher & Schüll in Düren, wenn das schwedische Filter kein ganz klares Filtrat liefert.

Dieses Verfahren hat nun den grossen Vorzug, dass das Filtrat sofort mit dem Polarisationsapparat auf seinen Gehalt an Glykogen untersucht werden kann. Ich werde dem Leser den Beweis liefern, dass diese Methode von unvergleichlicher Genauigkeit ist und ausserordentlich schnell zum Ziele führt, obwohl es sich um eine quantitative Methode handelt.

Das Merkwürdige ist, dass bei richtiger Ansäuerung der unreinen Glykogenlösung ein vollkommen farbloses Filtrat erhalten wird, das sich zur Polarisation ausgezeichnet eignet. Es ist wahr, dass zuweilen eine Färbung vorhanden ist, die mich aber fast niemals verhinderte, die Ablesung machen zu können, nachdem ich entsprechend verdünnt hatte. Wenn ich das Glykogen aus besonderen Gründen

mit 10 Vol. Alkohol gefällt hatte, machte sich der Farbstoff mit grösserer Entschiedenheit wie sonst störend geltend.

Die durch die schwache Ansäuerung der rohen Glykogenlösung erzeugten flockigen Niederschläge sind von sehr verschiedener Beschaffenheit, aber immer nur von geringem Gewicht, wenn sie auch nach der Fällung durch ihr aufgequollenes Volum als grosse Masse imponiren. Beim Abfiltriren dieser Fällungen sieht man, dass es sich nur um dünne Ueberzüge auf dem Filtrirpapier handelt. — Die Fällungen aus der Leberglykogenlösung sind immer stark gefärbt, und zwar sehr verschieden, so dass orangerothe, gelbe und schwarze vorkommen, die sich auch durch ihre Löslichkeit in Alkohol von 66 % und von Alcohol absolutus unterscheiden. Meist sind diese Farbstoffe in Aether unlöslich; doch ist dies nicht immer der Fall.

Stets ist ein grosser Theil der Farbstoffe in verdünntem Alkohol von 66 % und in absolutem Alkohol wie in Aether ganz unlöslich. —

Die bei der Glykogenanalyse der Muskeln auftretenden Farbstoffe sind immer mit der Leber verglichen in sehr geringer Menge vorhanden.

Bei grossem Reichthum an Glykogen ist die Menge der Verunreinigungen absolut und relativ viel geringer, und die Filtration vollzieht sich beim Auswaschen mit Alkohol sehr schnell und leicht.

Dass die Farbstoffflocken bei der Filtration keinen Fehler durch Zurückhaltung von Glykogen bedingen, habe ich schon früher streng bewiesen¹⁾. —

Ich gebe nunmehr zuerst eine Tabelle einer grossen Zahl von Glykogenanalysen des Froschkörpers. Stets wurden neun bis zehn Frösche gleichzeitig in Arbeit genommen, so dass also das Gesamtglykogen des ganzen Körpers zur Untersuchung kam. Dadurch werden die individuellen Schwankungen des Glykogengehaltes möglichst eliminirt. Das Genauere über die Einzelheiten der Tabelle findet sich in einer von mir bereits veröffentlichten Abhandlung, die ich hier aus bald ersichtlichen Gründen nochmals vorlege.

1) Eduard Pflüger, Unter gewissen Lebensbedingungen nimmt die in dem lebendigen Thierkörper enthaltene Menge des Glykogenes trotz vollkommener über Monate sich ausdehnender Entziehung der Nahrung fortwährend sehr erheblich zu. Dieses Archiv Bd. 120 S. 285, 1907.

Zahl der Frösche	Gewicht der Frösche	100 g Frösche enthalten. Glykogen in Gramm gemäss		Absoluter Unterschied
		Polarisation	Titration	
Weibliche Frösche.				
10	513,0	0,423	0,417	0,06
10	477,5	0,458	0,465	0,07
10	566,0	0,486	0,486	0,00
10	535,0	0,550	0,549	0,01
9	479,0	0,557	0,561	0,04
10	608,5	0,620	0,643	0,23
10	519,5	0,632	0,625	0,07
10	510,5	0,659	0,653	0,06
10	451,0	0,600	0,609	0,09
Summa	—	4,985	5,008	—
Männliche Frösche.				
10	492,5	0,632	0,639	0,07
10	410,0	0,626	0,589	0,37
5	196,5	0,733	0,749	0,16
10	441,0	0,719	0,709	0,10
9	416,0	0,719	0,689	0,30
9	345,0	0,872	0,867	0,05
Summa	—	4,301	4,242	—
3 männliche + 3 weibliche Frösche (Esculentae).				
10	492,5	0,632	0,639	0,07
10	510,0	0,755	0,7897	0,34
10	437,5	0,838	0,820	0,18
10	513,0	0,4235	0,417	0,06
10	600,0	0,607	0,609	0,02
10	483,0	0,828	0,812	0,16
Summa	—	4,086	4,087	—
1 R. fuscae ♀	146,0	1,618	1,590	0,03
2 " " ♂				
4 " " ♀				
6 " " ♂				
Summa	—	2,655	2,640	0,01
Gesamtsumme	—	16,027	15,977	0,05

Da die Zahl der Fälle = 23, so ist das allgemeine Mittel:

0,6965

0,6947

Die Tabelle beweist für das Froschglykogen, dass ausser dem Glykogen kein drehender Körper vorhanden war und nach Invertirung des Glykogenes neben dem Zucker keine Substanz, welche reducirend wirkte.

Gleichwohl ist es vorgekommen, dass in einem Ausnahmefall die Polarisation einen um 14 % höheren Werth als die Titration

ergab. Eingehende Wiederholung des Versuches bestätigte die That-
sache, so dass die Annahme einer abnormen, das Glykogen begleiten-
den Substanz kaum bezweifelt werden konnte.

Bei diesen polarimetrischen Bestimmungen des Glykogenes hat
man es im Allgemeinen mit Ablesungen von 2° zu thun; meistens
handelt es sich um geringere Werthe. Soviel ich gesehen habe,
unterscheiden sich die Ablesungen der besten Beobachter um $0,01^{\circ}$
bis $0,03^{\circ}$. Ist also die correcte Ablesung $1,000^{\circ}$, so wird ein Fehler
bis 3% begangen. Bei manchen Beobachtern ist aber der Fehler
noch viel grösser. Es lässt sich ja natürlich durch eine sehr grosse
Zahl von Ablesungen ein der Wahrheit entsprechendes Mittel er-
zielen, wie es bei Bestimmung der specifischen Drehung durchgeführt
werden muss. Bei den hier mitgetheilten Analysen war ein so hoher
Grad von Genauigkeit nicht geboten. Ich habe mich mit drei bis
sechs Ablesungen begnügt, jedesmal aber die Ablesungen mit der
Normalquarzplatte controllirt.

Hervorheben muss ich, dass alle Analysen von mir selbst ausgeführt
worden sind, ganz ohne jede Beihülfe eines Assistenten, was der
Gleichmässigkeit der Beobachtung halber nöthig war.

Ich wende mich jetzt zu Glykogenanalysen, die nur an Hunden
ausgeführt worden sind, bei denen nur die Leber oder die Muskeln
untersucht wurden. Bei dieser sehr ausgedehnten Untersuchung
habe **ich selbst** alle Glykogenuntersuchungen mit dem Polarisations-
apparat ausgeführt, während mein chemischer Assistent Herr Dr.
Peter Junkersdorf nach Invertirung des Glykogenes den Zucker
nach Fehling-Soxhlet titirte.

Es handelt sich in der That um eine Auslese aus sehr vielen
verschiedenartigen Untersuchungen, so dass die Ernährung der Hunde
sehr verschieden sich gestaltete. Viele von den Hunden waren vorher
mit Phloridzindosen diabetisch gemacht worden. Das Alles soll hier
nicht in Betracht gezogen werden, weil es sich nur darum handelt,
zu beweisen, dass unter den verschiedensten Ernährungsbedingungen
meine Methode der quantitativen Analyse in äusserst kurzer Zeit
absolut sichere Werthe liefert. Die Auslese der Analysen unterlag
natürlich der strengen Bedingung, dass alle Analysen mitgetheilt
sind, bei denen sowohl die Polarisation wie die Titration angewandt
worden ist.

Tabelle.

Nummer des Hundes	Gewicht des Hundes in kg	Gewicht der Leber in g	Glykogen der Leber in %		Absoluter Unter- schied	Glykogen der Muskeln in %	
			Polari- sation	Titration		Polari- sation	Titration
5	5,4	160,9	0,85	0,81	0,04	0,27	0,25
6	5,4	170,5	4,10	4,03	0,07	0,33	0,35
7	6,0	200,5	1,01	—	—	0,28	0,26
8	11,0	314,5	—	0,515	—	0,25	0,26
9	5,2	191,5	0,71	0,75	0,04	0,12	0,15
15	5,8	238,5	1,77	1,80	0,03		
17	6,7	181,0	3,08	3,15	0,07		
18	6,4	178,7	2,40	2,48	0,08		
19	5,1	189,7	4,41	4,28	0,13		
20	8,2	210,5	4,04	4,21	0,17		
21	9,7	297,5	2,70	2,62	0,08		
22	6,2	179,0	2,01	2,13	0,12		
25	8,4	235,5	1,33	1,34	0,01		
26	7,4	214,0	1,01	1,01	0,00		
30	8,7	271,5	2,06	2,17	0,11	0,86	0,86
31	5,0	138,5	2,03	2,09	0,06	0,76	0,75
32	9,7	285,5	2,10	2,20	0,10		
34	6,8	170,5	2,30	2,37	0,07		
35	8,5	248,5	1,50	1,52	0,02		
36	11,8	357,5	2,61	2,63	0,02		
38	7,5	208,0	2,29	2,18	0,11		
41	6,6	209,5	2,07	2,12	0,05		
42	8,7	211,5	2,81	2,67	0,14		
43	15,7	451,0	3,02	3,15	0,13		
50	9,0	252,5	1,03	1,06	0,03		
52	7,9	255,0	4,48	4,44	0,04		
53	6,4	244,5	2,76	2,79	0,03		
54	19,9	337,0	1,68	1,64	0,04		
55	4,3	213,0	1,87	1,91	0,04		
56	10,0	303,5	2,78	2,75	0,03		
57	13,2	340,5	3,45	3,46	0,01		
59	9,2	255,0	1,20	1,23	0,03		
62	7,9	250,0	1,30	1,31	0,01		
63	3,5	168,0	0,99	1,16	0,17		
64	15,0	431,0	2,08	2,12	0,04		
65	2,5	103,0	1,02	1,02	0,00		
66	6,4	176,0	1,40	1,39	0,01		
67	6,9	135,0	1,81	1,85	0,04		
68	6,3	219,0	1,00	1,00	0,00		
77	5,1	224,5	1,74	1,75	0,01		
78	7,3	312,0	1,54	1,50	0,04		
79	3,7	141,2	1,80	1,82	0,02		
80	3,6	133,0	1,94	1,92	0,02		
81	5,0	179,0	1,87	1,93	0,06		
82	11,4	372,0	3,42	3,48	0,06		
83	5,1	202,5	0,85	0,86	0,01		
84	8,7	253,5	3,01	2,99	0,02		
85	7,6	243,5	3,11	3,13	0,02		
86	11,9	454,0	4,13	4,21	0,08		
119	9,7	290,0	3,21	3,16	0,05		
Summe			106,9	107,5	—	28,7	28,8
Mittel			2,227	2,239	—	—	—

Diese Untersuchungen beweisen also, dass durch die Polarisation der Glykogenegehalt schnell und richtig gefunden wird. Nur in sehr seltenen Fällen stimmt die Bestimmung durch Polarisation nicht ganz mit der Titration nach Fehling-Soxhlet überein. Sehr gross sind die Unterschiede aber auch nicht. — Wünschenswerth bleibt deshalb die Controlle der Polarisation durch die Titration.

Weil man durch die Polarisation sehr annähernd den Gehalt an Zucker kennt, der durch Invertirung der Glykogenlösung entstehen muss, führt die Titration meist in wenigen Minuten zu einem sicheren Ergebniss, während die gravimetrische Methode immer einige Stunden erfordert. Ich habe deshalb die gravimetrische Methode mit Volhard's Berichtigung nur angewandt, wo der Farbstoffgehalt der Glykogen- und Zuckerlösung die polarimetrische und Fehling'sche Bestimmung unsicher oder unmöglich machte, oder wo die zu kleine zu bestimmende Zuckermenge die Titration nicht mehr ausführbar erscheinen liess. —

Demnach gestaltet sich die Analyse folgendermaassen: Ich fülle ein Rohr von 189,4 mm Länge mit der zu untersuchenden Glykogenlösung und mache am Halbschattenapparat drei Ablesungen

+ 2,10°	
+ 2,08°	Quarzplatte: + 5,60°
+ 2,08°	Soll: + 5,55°
Mittel: + 2,087°	+ 0,05°
Corrigirt: + 2,066°	

Weil nun die specifische Drehung der Dextrose = + 52,60°¹⁾ und die des Glykogenes = + 196,57°²⁾, so hat man

$$\frac{196,57^\circ}{52,60^\circ} = 3,74 \text{ und } \frac{2,066^\circ}{3,74} = 0,552 \text{ Glykogen.}$$

Von dieser Glykogenlösung werden nun 90 ccm in einem 150 ccm-Kölbchen mit 5 ccm Salzsäure von 1,19 spec. Gew. 3 Stunden erhitzt, abgekühlt mit 60 % iger Kalilauge neutralisirt, bis zur Marke aufgefüllt und durch schwedisches Filter filtrirt, weil sich noch einige Farbstofflöckchen ausgeschieden haben.

1) H. Landolt, Das optische Drehungsvermögen organischer Substanzen, II. Aufl., S. 446. 1898.

2) M^{me} Gatin-Grużewska, Das reine Glykogen. Dieses Archiv Bd. 102 S. 577. 1904.

Invertirt wurden $\frac{9}{10}$ des in 100 ccm gelösten Glykogenes, also $0,552 - 0,0552 = 0,4968$ g Glykogen.

Nun hat Nerking durch eine genaue Untersuchung folgende Gleichung festgestellt:

$$\text{Glykogen} = \text{Zucker} \times 0,927.$$

Daraus folgt, dass 0,4968 Glykogen liefern müssen 0,5359 Dextrose, welche wir in 150 ccm gelöst hatten, so dass die Lösung 0,3573 % Dextrose enthält.

Zur Analyse nach Fehling-Soxhlet wurden 10 ccm Kupferseignettesalzlösung + 40 ccm Wasser gebraucht, für deren vollkommene Reduction 0,050 g Dextrose in runder Zahl nöthig sind. Weil unsere Zuckerlösung gemäss des durch Polarisation bestimmten Werthes 0,3573 g Dextrose in 100 ccm enthält, würden rund 14 ccm dieser Zuckerlösung nöthig sein, um die 10 ccm Fehling vollkommen zu reduciren. Bei der ersten Analyse und Zusatz von 14 ccm Zuckerlösung gab das Filtrat der 2 Minuten gekochten Mischung noch eine Spur Reaction mit Ferrocyankalium; bei Anwendung von 14,2 ccm reagirte das Filtrat nicht mehr auf dies Reagens. Also 14,1 ccm = 0,05 g Dextrose, also 100 ccm = 0,355 und 150 ccm = 0,533. Da dies nur $\frac{9}{10}$ der Gesamtmenge, so beträgt diese 0,592 g Dextrose, entsprechend 0,549 Glykogen.

Also:

Gemäss Polarisation: 0,552 g Glykogen,

„ Titration: 0,549 „ „

Der Unterschied beträgt absolut:

0,003 g Glykogen.

Bei dem vorliegenden Versuch entsprachen:

113 g Frosch = 0,552 g Glykogen oder

100 „ „ = 0,488 „ „

Betreffend die gravimetrische Methode verweise ich auf mein Werk: Glykogen (S. 53 und 111). —

Ich möchte endlich noch auf den Vorzug meiner Methode aufmerksam machen, welcher es ermöglicht, die kleinsten Mengen von Glykogen quantitativ genau zu bestimmen, selbst da noch, wo die Titration, ja die gravimetrische Analyse versagen. Ich bestimme mit meinem Polarimeter noch Werthe von 0,05 bis 0,01 g Glykogen auf 100 g Leber oder Muskel, und ich habe von diesem Vorthail

vielfachen Gebrauch gemacht. — Sehr oft wird man bei der Seltenheit der Incongruenz zwischen Polarisation und Titration auf Inversion und Titration zur grossen Abkürzung verzichten dürfen!

Schliesslich möchte ich noch einmal auf ein Ergebniss dieser Untersuchung zurückkommen, das ich für äusserst wichtig ansehe.

Es hat sich als sicher herausgestellt, dass das aus dem Körper der Frösche isolirte Glykogen derselbe Stoff ist, wie das aus der Leber oder den Muskeln des Hundes isolirte Glykogen. Denn alle auf die specifische Drehung und die Beziehung des Glykogenes zu dem resultirenden Zucker bei der Inversion bezüglichen Werthe stimmen genau überein. Es muss hinzugefügt werden, dass nach den Untersuchungen von J. Nerking¹⁾ und von Mme Z. Gatin-Grużewska²⁾ dasselbe für das Glykogen des Pferdes und Hundes festgestellt worden ist. Man darf wohl annehmen, dass das Glykogen aller Thiere und aller Organe dieselbe Substanz ist. Die Arteigenschaft fehlt also dem Glykogen. Da nach Allem, was wir wissen, auch der Traubenzucker in den Säften der Thiere überall derselbe Stoff ist, dürfen wir weiter folgern, dass die thierischen Kohlehydrate die Eigenschaft der Arteigenthümlichkeit nicht besitzen. — Es liegen aber ferner keine Thatsachen vor, dass die Fettarten, welche in den Organen verschiedener Thiere vorkommen, sich durch Arteigenthümlichkeiten auszeichnen. — Nur für die Eiweissstoffe gilt die merkwürdige Thatsache, dass jeder Thierart besondere Eiweissarten eigenthümlich sind.

Weil die Eiweissmoleküle verschiedener Thiere eine verschiedene chemische Constitution haben, ist es selbstverständlich, dass sie auch wieder verschiedene Spaltungsproducte liefern werden. Also nicht das Eiweiss an sich, sondern auch die Derivate desselben müssen Arteigenthümlichkeit aufweisen. Ich würde es deshalb in hohem Grade wahrscheinlich finden, dass in den Gallensäuren, die ja Arteigenthümlichkeit zeigen, nicht bloss die stickstoff- und schwefel-

1) J. Nerking, Ueber die elementare Zusammensetzung und das Invertierungsvermögen des Glykogenes. Dieses Archiv Bd. 85 S. 329. 1901.

2) Mme Z. Gatin-Grużewska, Das reine Glykogen. Dieses Archiv Bd. 102 S. 579, 580. 1904.

haltige Componente, d. h. das Glykokoll und das Taurin, sondern auch die stickstoff- und schwefelfreie — nämlich die Cholalsäure — aus dem Gefüge des Eiweissmoleküles stammen, weil diese Säure Arteigenthümlichkeiten besitzt. In der Erkenntniss der Ausnahmestellung der Eiweissstoffe, die sie mit Rücksicht auf die Arteigenthümlichkeit zeigen, wird uns ein höchst werthvolles Mittel an die Hand gegeben, um den Beziehungen der verschiedenen Stoffe des Thierkörpers näher zu treten. —

Selbstverständlich bin ich der Ansicht, dass hier zwei ganz verschiedene Kreise von Arteigenthümlichkeiten in Betracht kommen.

Der eine Kreis umfasst diejenigen Thatsachen, welche sich auf die verschiedenen im Thierreich auftretenden Arten der Eiweissstoffe und ihrer Derivate beziehen — im Gegensatz zu den Fetten, Kohlehydraten und Mineralstoffen, deren Molekülen die Arteigenthümlichkeit fehlt. —

Der zweite Kreis ist dadurch gekennzeichnet, dass unabhängig von der chemischen Qualität der Moleküle das Mischungsverhältniss derselben bei verschiedenen Thierarten ein sehr verschiedenes sein kann.

Obwohl diese Thatsachen einfach genug erscheinen, komme ich hier nochmals darauf zurück, weil Niemand vor mir die grosse Bedeutung dieser Gebiete erkannt hat. Denn in den neuesten Lehrbüchern der physiologischen Chemie, wie bei Thierfelder, Hammarsten, ja sogar in den „Ausblicken“ von Abderhalden finde ich nirgends eine Andeutung.