(Physiologisches Laboratorium in Bonn.)

Ueber die Einwirkung verdünnter Kalilauge auf Glykogen bei 100° C.

Von

E. Pflüger.

Ich habe bewiesen¹⁾, dass Glykogen beim Erhitzen auf 100° C. durch Kalilauge von hoher Concentration nicht zersetzt wird.

Man hatte ja bisher auf Grund der Versuche von v. Vintschgau und Dietl²⁾ u. s. w. als sicher angenommen, dass eine Glykogenlösung durch Kalilauge zerstört werde. Diese Versuche sind aber immer nur mit verdünnter, d. h. 1 bis 2%iger Kalilauge ausgeführt worden. Es musste desshalb die Möglichkeit geprüft werden, ob diese verdünnte Kalilauge beim Kochen das Glykogen zersetzt.

Wie ich bereits vor Kurzem³⁾ berichtet habe, erhielt ich in der That 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 an- „gegriffen wurde. Der Verlust betrug 3,9%.“

Weil ich einen Beobachtungsfehler vermuthete, versprach ich, den Versuch sofort zu wiederholen und darüber zu berichten. Ich löse dies Versprechen hiermit ein. —

Um vollste Sicherheit zu erzielen, wurde bei der Gewinnung des Glykogenes die Anwendung jeder Säure sowie der Brücke'schen Reagentien ausgeschlossen.

Zuerst prüfte ich, ob mein Filtrirpapier etwa, wenn es wie bei einem Versuche benutzt wird, Kohlehydrate abgibt. Ich untersuchte also mein schwedisches Filtrirpapier. Es stammt laut Aufschrift der

1) Dieses Archiv Bd. 90 S. 523 (9. Juni 1902); dieses Archiv Bd. 91 S. 119 (1902).

2) Dieses Archiv Bd. 13 S. 253 und Bd. 17 S. 154.

3) Dieses Archiv Bd. 92 S. 101 (1902).

Packete aus J. H. Munktell's Fabrik. Meine Filter haben den Durchmesser von 15 cm und zeichnen sich dadurch aus, dass sie alkalischen Laugen von beträchtlicher Stärke widerstehen.

Ich nahm 400 ccm Kalilauge von 15 % KOH + 400 ccm Alkohol von 96 % Tr.; eine Mischung, welche beim Abfiltriren des Glykogenes öfter gebraucht wird. Ich filtrirte diese 800 ccm Lösung, welche vollkommen klar war, durch das schwedische Filter. Die Filtration vollzog sich auffallend langsam und nahm viele Stunden in Anspruch. Nachdem vollkommen abgetropft war, steckte ich den Trichter auf ein 300 ccm-Kölbchen und goss 100 ccm 2,2 % ClH auf. Das Filtrat war bereits scharf sauer; dann wusch ich das Filter mit noch ungefähr 200 ccm ClH von 2,2 % aus. Als das 300 ccm-Kölbchen annähernd gefüllt war, wurde es zur Invertirung im Wasserbad 3 Stunden erhitzt. Ich verfuhr sodann wie bei einer Zuckeranalyse nach Pflüger. Es war aber keine Spur einer Abscheidung von Kupferoxydul zu sehen, obwohl ich die blaue Flüssigkeit 24 Stunden bedeckt im Becherglas stehen liess. Unter beschriebener Bedingung unterliegt es also keinem Bedenken, die schwedischen Filter zu benutzen. —

Wenn der Organbrei in 30 %iger Kalilauge von 100° in Lösung gebracht ist, verdünne ich auf das doppelte Volum, so dass ich eine Flüssigkeit mit 15 % KOH erhalte, welche filtrirt werden muss, weil stets Flöckchen vorhanden sind. Am bequemsten wären die gehärteten grossen Filter von Schleicher & Schüll Nr. 575 von 32 cm Durchmesser. Weil hier das gelöste Glykogen in das Filtrat übergeht, fragt es sich, ob die alkalische Lösung ein Kohlehydrat aus dem Papier mitnimmt. Ich nahm also 400 ccm einer wässrigen Lauge von 15 % KOH und filtrirte sie drei Mal durch das Filter und versetzte dann das vollkommen klare Filtrat mit 400 ccm Alkohol von 96 % Tr. Nach einigen Stunden hatten sich einige spärliche, leichte, durchsichtige, farblose Wölkchen ausgeschieden.

Ich filtrirte dieselben nach 24 Stunden durch das schwedische 15 cm-Filter ab, liess gut abtropfen und spülte dann, wie oben berichtet, das Filter mit 2,2 % ClH so aus, dass das saure Filtrat in ein 300 ccm-Kölbchen floss und dieses beinahe bis zur Marke gefüllt war. Nach Inversion untersuchte ich den Gehalt an Zucker, wie es bei einer Glykogenbestimmung von mir stets ausgeführt wird. Unmittelbar nach der $\frac{1}{2}$ stündigen Erhitzung der Allihn'schen Kupferlösung war von Kupferoxydul nichts zu sehen. Als ich aber nach 24 stündigem

Stehen untersuchte, konnte ich auf dem Boden einen feinen Staub erkennen, der nach dem vorsichtigen Abgiessen der blauen Flüssigkeit sich als ein rothes Pulver darstellte, welches ein wenig mehr war, als man wohl unter Umständen durch die Selbstreduction entstanden wahrnimmt¹⁾. Wenn nun auch der durch dieses sonst so vorzügliche gehärtete Filtrirpapier bedingte Fehler meist wohl vernachlässigt werden darf, musste ich für diesmal die Filtration der wässerigen alkalischen Flüssigkeit mit Hülfe von Asbest oder Glaswolle vollziehen. Denn es kommt bei diesen Versuchen auf sehr kleine Unterschiede an, und es handelt sich um eine Frage von grundsätzlicher Bedeutung.

Reihe I.

250 g frischer Pferdefleischbrei in einen 500 ccm-Kolben von Jenaer Glas gebracht und hinzugegossen 250 ccm Lauge von 60% KOH. Das Kalipräparat ist das beste im Handel vorkommende, das in der Preisliste von C. A. F. Kahlbaum aufgeführt ist als Kaliumhydrat Ia „Merck“, das Kilo zu 6,60 Mark.

Die Dauer der Erhitzung betrug 16 Stunden.

Nach Abschluss der Erhitzung wird ein Literkolben mit 500 ccm-kohlensäurefreien Wassers gefüllt, letzteres zum Kochen erhitzt und dazu die alkalische Fleischlösung siedend eingegossen und zur Abkühlung hingestellt. Durch Asbest filtrirt. Wegen der Langsamkeit der Filtration erhielt ich über Nacht nur

420 ccm ganz klarer rother Lösung.

Ich fällte mit 420 ccm Alkohol von 96% Tr. und decantirte nach einigen Stunden von dem am Boden liegenden Glykogenbrei, den ich dann auf ein Asbestfilter brachte und nach gutem Abtropfen mit einer Flüssigkeit mehrmals wusch, die gleich viel Alkohol und KOH enthält wie die Lösung, aus der das Glykogen ausgeschieden worden war.

Das Glykogen wurde dann in heissem Wasser gelöst und zu 650 ccm aufgefüllt. Hiervon wurden aus immer derselben Bürette

1) Der chemische Assistent des Bonner physiologischen Institutes, Herr Dr. Heyer, hat sich überzeugt, dass durch 10 maliges Auswaschen (Filtration) der gehärteten Faltenfilter das in 15%iger kalter Kalilauge lösliche Kohlehydrat ausgewaschen werden kann. Um solches Filter dann zu benutzen, müsste das Kali wieder mit Wasser ausgezogen und das Papier getrocknet werden.

je 100 ccm für jeden Versuch abgemessen. 100 ccm dieser Glykogenlösung bedürfen zur Neutralisation 2 ccm ClH von 4,4 %.

Versuch I.

Bestimmung des Gehaltes an Glykogen.

100 ccm Glykogenlösung in 300 ccm-Kolben abgemessen.

+ 2 ccm ClH von 4,4 % zur Neutralisation des in der Glykogenlösung enthaltenen Alkalis.

+ 100 ccm ClH von 4,4 %.

+ ClH von 2 % q. s.

Invertirung. Nach dieser Invertirung ist die Flüssigkeit schwach wie durch feinsten Staub getrübt. Nach Abkühlung und Auffüllung auf 300 ccm mit ClH von 2 % Filtration durch trockenes schwedisches Filter. Filtrat ganz klar und farblos.

81 ccm der erhaltenen Zuckerlösung liefern:

Analyse 1. $0,1826 \text{ Cu}_2\text{O}$ (Rohr 4) = $0,1622 \text{ Cu}$.

Analyse 2. $0,1816 \text{ Cu}_2\text{O}$ (Rohr 10).

Die Controle nach Volhard mit Rohr 4 ergibt: $0,1597 \text{ Cu}$ = $0,074 \text{ Zucker}$.

Also

$100 \text{ ccm Glykogenlösung} = 0,274 \text{ g Zucker}$.

Versuch II.

Bestimmung des Gehaltes an Glykogen, das diesmal mit Alkohol vor der Invertirung gefällt wird.

100 ccm Glykogenlösung in's Becherglas abgemessen und auf 2 % KOH gebracht.

200 ccm Alkohol 96 % Tr.

Glykogen durch schwedisches Filter abfiltrirt, in 300 ccm-Kolben nach Neutralisation gebracht, beinahe mit Wasser und ClH aufgefüllt, so dass die Lösung 2,2 % ClH enthält. Nach Inversion Verfahren wie bei dem vorherigen Versuch.

81 ccm der Zuckerlösung liefern:

Analyse 1. $0,1773 \text{ Cu}_2\text{O}$ (Rohr 3) = $0,1574 \text{ Cu}$.

Analyse 2. $0,1779 \text{ Cu}_2\text{O}$ (Rohr 12).

Die Controle nach Volhard ergab mit Rohr 3

$0,1591 \text{ Cu} = 0,07365 \text{ Zucker}$.

Also:

$100 \text{ ccm Glykogenlösung} = 0,273 \text{ g Zucker}$,

Dieser Versuch beweist noch, dass aus einer 2% Kali enthaltenden Lösung das Glykogen durch 2 Volumina Alkohol von 96% Tr. vollständig ausgefällt wird.

Versuch III.

100 ccm Glykogenlösung + 4 g. KOH (6,6 ccm Lauge von 60% KOH) + aq. q. s. in's 200 ccm-Kölbchen, 20 Stunden erhitzt. —

Nach Abkühlung im 200 ccm-Kölbchen mit ClH von 1,19 sp. Gew. genau neutralisirt, dann in ein 300 ccm-Kölbchen gegossen und letzteres mit dem Spülwasser aus dem 200 ccm-Kölbchen + 15 ccm ClH von 1,19 = 6,6 g ClH fast aufgefüllt. Nach Inversion und Filtration durch trockenes schwedisches Filter liefern 81 ccm der Zuckerlösung:

Analyse 1. 0,1850 Cu₂O (Rohr 3) = 0,1642 Cu.

Analyse 2. 0,1854 Cu₂O (Rohr 12).

Die Controle für Rohr 3 nach Volhard liefert:

0,1591 Cu = 0,0737 Zucker.

Also:

100 ccm Glykogenlösung = 0,273 g Zucker.

Versuch IV.

Dieser Versuch wurde genau so wie Versuch III ausgeführt. Nur habe ich das Glykogen vor der Inversion erst mit Alkohol gefällt. Das 200 ccm-Fläschchen wurde entleert, ausgespült und die Flüssigkeit auf 300 ccm gebracht, der so viel KOH zugesetzt worden war, dass sie 3% KOH enthielt. Gefällt mit 300 ccm Alkohol von 96% Tr. — Das Glykogen wird abfiltrirt und im 300 ccm-Kölbchen invertirt, wie es vorher bei Versuch II dieser Reihe ausgeführt worden ist.

81 ccm der Zuckerlösung liefern:

Analyse 1. 0,1797 Cu₂O = 0,1598 Cu (Rohr 4).

Analyse 2. 0,1784 Cu₂O (Rohr 10).

Die Controle nach Volhard ergab mit Rohr 4:

0,1553 Cu = 0,0718 g Zucker.

Also:

100 ccm Glykogenlösung = 0,266 g Zucker.

Ergebnisse der Reihe I.

Vergleichen wir die am nächsten vergleichbaren Versuche:

Versuch I. Gehalt der Glykogenlösung vor Kochen mit Kali = 0,274 % Zucker.

Versuch III. Gehalt der Glykogenlösung nach 20 stündigem Kochen mit 2 % Kali = 0,273 % Zucker.

Verlust 0,4 %.

Versuch II. Gehalt der Glykogenlösung vor Kochen mit Kali, aber Fällung des Glykogenes mit Alkohol = 0,273 %.

Versuch IV. Gehalt der Glykogenlösung nach 20 stündigem Kochen mit Kali, aber Fällung des Glykogenes mit Alkohol = 0,266 %.

Verlust = 2,6 %.

Es wird zweckmässig sein, das Ergebniss der folgenden Reihe kennen zu lernen, ehe wir zu einer Beurtheilung der Versuche schreiten.

Reihe II.

250 g frischer Pferdefleischbrei in 500 ccm-Kolben von Jenaer Glas; hinzugefügt 250 ccm kalter Lauge von 60 % KOH. Flasche, mit Uhrglas bedeckt, in's Wasserbad, das sofort erhitzt wird. Erhitzung dauert 16 Stunden.

In einem Literkolben werden 500 ccm Wasser gekocht und die noch heisse Fleischlösung hinzugegossen, abgekühlt, durch Glaswolle mit Beihülfe der Saugpumpe filtrirt. Das Filtrat ist trübe.

Ich nehme 800 ccm Filtrat

800 ccm Alkohol von 96 % Tr.

Nach Absetzen des Niederschlages giesse ich die vollkommen klare Flüssigkeit ab und filtrire den Niederschlag durch Glaswolle ohne Saugen. Das Filtrat ist anfangs trüb; abermals auf das Filter gegossen wird dasselbe sonnenklar. Nach gutem Abtropfen und Auswaschen mit alkalischem Weingeist löse ich den Glykogenklumpen in siedendem Wasser.

Die trübe Brühe des Filtrates wurde auf 500 ccm mit sterilisirtem Wasser aufgefüllt und durch schwedisches Filter filtrirt. Das Filtrat zeigt weisse Opaleszenz; auf dem Papier bleibt grünliche Schmiere.

500 ccm dieses Filtrates werden durch Zusatz von 15 g KOH, d. h. von 25 ccm meiner Lauge von 60 % KOH, auf 3 % KOH gebracht und mit 500 ccm Alkohol von 96 % Tr. gefällt. Das Glykogen scheidet sich pulvrig, flockig und schön weiss aus. Nachdem die Flüssigkeit mehrere Tage gestanden, ist sie sonnenklar und lässt sich fast ganz so abgiessen, dass das weisse, weiche Glykogen auf dem Boden des Becherglases liegen bleibt. Nach gutem Abtropfen löse ich im Becherglase mit sterilisirtem Wasser zu 550 ccm, mit denen folgende Versuche ausgeführt werden.

Versuch I.

Bestimmung des Gehaltes an Glykogen durch unmittelbare Inversion ohne vorherige nochmalige Fällung des Glykogenes mit Alkohol.

100 ccm Glykogenlösung in ein 300 ccm-Kölbchen gemessen, mit Wasser q. s. und ClH so aufgefüllt, dass die Lösung 2,2 % ClH enthält. Nach Inversion abgekühlt, auf 300 ccm genau aufgefüllt. 81 ccm dieser Zuckerlösung lieferten:

$$0,2608 \text{ g Cu}_2\text{O} = 0,2317 \text{ Cu (Rohr 4).}$$

Die Controle nach Volhard lieferte:

$$0,2319 \text{ Cu} = 0,1099 \text{ Zucker.}$$

Also:

$$100 \text{ ccm Glykogenlösung} = 0,407 \text{ g Zucker.}$$

Der Versuch wurde wiederholt mit einem anderen Asbestfilterröhrchen (Nr. 10), und es wurde gefunden nach Volhard:

$$0,2315 \text{ Cu} = 0,1097 \text{ Zucker.}$$

Also:

$$100 \text{ ccm Glykogenlösung} = 0,4052 \text{ Zucker.}$$

$$\text{Mittel: } 100 \text{ ccm Glykogenlösung} = 0,406 \text{ Zucker.}$$

Versuch II.

Der vorhergehende Versuch hat den Gehalt an Kohlehydrat in 100 ccm Lösung festgestellt. Es fragt sich, ob das ganze Glykogen mit einem gleichen Volum Alkohol von 96 % Tr. bei Gegenwart von 4 % KOH abgeschieden werden kann.

100 ccm Glykogenlösung,

6,6 ccm Lauge von 60 % HOH,

110 ccm Alkohol von 96 % Tr.

Nach 24 Stunden durch schwedisches Filter filtrirt. Glykogen bleibt fast ganz im Becherglas. Nach Abtropfen der weingeistigen Flüssigkeit wird das das Glykogen noch enthaltende Becherglas unter den Trichter gebracht und dieser mit Wasser aufgefüllt, so dass das abfließende Filtrat das Glykogen im Becherglas löst. Nun wirft man ein kleines Stückchen Lackmuspapier in die Flüssigkeit und lässt aus einer Bürette ClH (von 1,19) hinzufliessen, bis Neutralität erreicht ist. Nöthig waren 0,35 ccm ClH. Diese neutrale Lösung wird nun in einen 300 ccm-Kolben eingeführt mit Hilfe eines Trichters und hinzugefügt 6,6 g ClH = 15 ccm ClH von 1,19 spec. Gew. — Darauf schiebe ich den 300 ccm-Kolben mit dem aufgesteckten Trichter unter das Abflussrohr des das Filter tragenden Trichters und giesse so lange Wasser auf, bis der 300 ccm-Kolben beinahe bis zur Marke gefüllt ist. Zuletzt überzeuge ich mich, dass das Filter an das Filtrationswasser nichts mehr abgibt. Denn Alkohol bringt keine Spur einer Trübung mehr hervor in dem Filtrate.

Nach ausgeführter Inversion fand ich in 81 ccm:

$$0,2611 \text{ g Cu}_2\text{O} = 0,232 \text{ Cu} = 0,110 \text{ g Zucker.}$$

Die Controle nach Volhard ergab:

$$0,2311 \text{ Cu} = 0,1095 \text{ g Zucker.}$$

Also:

$$100 \text{ ccm Glykogenlösung} = 0,4056 \text{ g Zucker.}$$

Diese Versuche sind noch desshalb von besonderer Wichtigkeit, weil sie zeigen, dass ein gleiches Volum Alkohol von 96 % Tr. das Glykogen aus einer wässerigen Lösung von 4 % KOH vollständig ausfällt.

Versuch III.

100 ccm Glykogenlösung abgemessen in ein 200 ccm-Kölbchen,
6,6 ccm Lauge von 60 % KOH,

Wasser q. s., um das Volum beinahe auf 200 ccm zu bringen.

Die Lösung enthält vor dem Kochen annähernd 2 % KOH. — Das Kochen wird 19 $\frac{1}{2}$ Stunde im Wasserbad fortgesetzt, abgekühlt, etwas Reagenspapier in das 200 ccm-Kölbchen, neutralisirt mit ClH von 1,19. Dann ausgegossen in einen 300 ccm-Kolben, das 200 ccm-Kölbchen mit 15 ccm ClH von 1,19 ausgespült und in den 300 ccm-Kolben nachgefüllt, dann mit Wasser gespült, bis der 300 ccm-Kolben fast bis zur Marke gefüllt ist. Wenn man so verfährt, ist man vor

jedem Verlust gesichert. Nach Invertirung lieferten 81 ccm der Zuckerlösung:

$$0,2585 \text{ g Cu}_2\text{O} = 0,2296 \text{ g Cu (Rohr 10).}$$

Die Controle nach Volhard ergab:

$$0,2286 \text{ g Cu} = 0,1082 \text{ g Zucker.}$$

Die Wiederholung ergab:

$$0,2595 \text{ g Cu}_2\text{O} = 0,2304 \text{ g Cu (Rohr 4).}$$

Die Controle nach Volhard = 0,2286.

Also 81 ccm Lösung = 108,23 mg Zucker und 100 ccm Glykogenlösung = 0,401 g Zucker.

Versuch IV.

Genau wie der vorhergehende Versuch angestellt, d. h. dieselbe Menge Glykogen wurde 19½ Stunde in Kalilauge von 2% im Wasserbad erhitzt.

Diesmal soll aber das Glykogen erst durch Alkohol gefällt werden. Die Lösung enthält bereits 4 g KOH; da sie des Spülens halber auf 300 ccm gebracht wird und 4% KOH enthalten soll, wurden noch 8 g KOH = 13,3 ccm Lauge von 60% hinzugefügt und die erhaltenen 300 ccm mit 300 ccm Alkohol von 96% Tr. gefällt. Fällt nicht flockig; weiss wie Milch, wie durch feinsten Staub getrübt. Allmählich hat sich das Glykogen als weiche, weisse, flockige Masse zu Boden gesenkt. Einiges sitzt aber am Glase. Nach 24 Stunden vollkommene Klärung. Filtrirt auch ohne Spur von Trübung durch das schwedische Filter. Fast alles Glykogen bleibt nach Abgiessen der Flüssigkeit im Becherglase. Um nun ohne Verlust das Glykogen in den 300 ccm-Kolben zu bringen und mit 2,2% ClH im Wasserbad zu erhitzen, verfuhr ich genau so, wie es bei Versuch II beschrieben ist.

81 ccm Zuckerlösung lieferten:

$$0,2554 \text{ Cu}_2\text{O} = 0,2269 \text{ Cu.}$$

Die Controle nach Volhard ergab

$$0,22661 \text{ Cu} = 0,1072 \text{ g Zucker.}$$

Also:

$$100 \text{ ccm Glykogenlösung} = 0,397 \text{ g Zucker.}$$

Ergebnisse.

Vergleichen wir vorerst die Versuche, bei denen das Glykogen vor der Invertirung nicht mit Alkohol gefällt wurde, so dass der Gehalt an Kohlehydrat ohne Verlust zu Tage treten muss, so haben wir;

Versuch I: Gehalt ohne Kochen mit Kali 0,406 % Zucker.

Versuch III: Gehalt nach dem Kochen mit 2 % Kali
0,401 % Zucker.

Verlust = 1,2 %.

Vergleichen wir ferner die zwei Versuche, bei denen das Glykogen vor der Invertirung mit Alkohol gefällt wurde, so ergibt sich:

Versuch II: Gehalt an Glykogen ohne Kochen mit KOH
= 0,4056 % Zucker.

Versuch IV: Gehalt an Glykogen nach Kochen mit 2 %
KOH = 0,3970 % Zucker.

Verlust = 2,1 %.

(Siehe Tabelle S. 87.)

Reihe III.

Die bisher mitgetheilten zwei Versuchsreihen waren in der Art ausgeführt worden, dass der kalte Fleischbrei in die kalte Kalilauge eingetragen und das die Mischung enthaltende Gefäss dann in das siedende Wasserbad getaucht wurde. Es war nicht undenkbar, dass wegen des langsamen Steigens der Temperatur eine Veränderung des Glykogenes sich vollzog, die in der Bildung von Glykogen-Dextrin ihren Ausdruck fand. F. W. Pavy behauptet aber, dass Dextrin von Kalilauge angegriffen wird. Desshalb machte ich noch Reihe III und verfuhr folgendermaassen.

500 ccm Lauge von 60 % KOH (Marke I^a „Merck“) wurden in einem Literkolben auf 100° C. erhitzt, sodann in Klümpchen allmählich 500 g ganz frischer Fleischbrei eingetragen. Fortwährend wird die Flüssigkeit umgeschwenkt, damit sich die Fleischtheilchen möglichst vertheilen. Weil die Flasche auf einem Drahtnetz über einer kleinen Flamme steht, ist es möglich, zu verhindern, dass das kalte Fleisch die Temperatur der Flüssigkeit stärker herabdrücke. Mit einem Thermometer controlirte ich fortwährend und fand, dass die Temperatur von 92° bis 110° C. schwankte. Nachdem die 500 g Fleischbrei eingeführt waren, ergab sich, dass schon fast Alles gelöst war. Gleichwohl erhitzte ich im siedenden Wasserbad noch 2 Stunden.

In einem Kolben von 2 Liter Gehalt brachte ich 300 ccm Wasser zum Kochen, goss die siedende Fleischlösung hinein und spülte den

Allgemeine Uebersicht.

Versuche mit Glykogen, das ohne Säuren und mit Ausschluss der Brücke'schen Reagentien dargestellt worden ist. Die Menge des Glykogenes in 100 ccm Lösung ist als Zucker angegeben in Gramm.

Nr.	Vor Kochen mit Kali Gehalt an Glykogen		Nach Kochen mit 2%iger Kalilauge Gehalt an Glykogen				Verlust an Glykogen durch das Kochen mit 2%iger Kali- lauge
	bestimmt, ohne dass das Glyko- gen vor der In- version mit Alkohol gefällt wurde	bestimmt, indem das Glykogen vor der Inversion mit Alkohol gefällt wurde	bestimmt, ohne dass das Glykogen vor der Inversion mit Alkohol ge- fällt wurde		bestimmt, indem das Glykogen vor der Inversion mit Alkohol ge- fällt wurde		
			Kochdauer		Kochdauer		
Reihe I							
1.	0,274 ‰	0,273 ‰	—	—	—	—	—
2.	—	—	—	—	—	—	0,37 ‰
3.	—	—	0,273 ‰	20 Stunden	—	—	2,56 ‰
4.	—	—	—	—	0,266 ‰	20 Stunden	—
Reihe II							
1 a.	0,407 ‰	—	—	—	—	—	—
1 b.	0,406 ‰	—	—	—	—	—	—
2.	—	0,4056 ‰	—	—	—	—	—
3.	—	—	0,4010 ‰	19,5 Stunden	—	—	1,2 ‰
4.	—	—	—	—	0,397 ‰	19,5 Stunden	2,1 ‰

Literkolben mit 200 ccm siedenden Wassers aus, das auch in den 2 Literkolben nachgefüllt wurde. Nach Abkühlung wird mit sterilisiertem Wasser aufgefüllt und dann die Flüssigkeit zur Erzielung gleichmässiger Mischung in ein grosses Becherglas entleert. Die Mischung enthielt einen sehr feinen Staub.

Das Filtrat, welches der mit Glaswolle beschickte Trichter lieferte, war anfangs ein wenig getrübt, wurde aber zurückgegossen vollkommen klar. Da die Filtration langsam von statten ging, waren 10 Stunden nöthig, bis ich 300 ccm Filtrat gewonnen hatte. Ich fällte mit 300 ccm Alkohol von 96 % Tr. Grobflockige Ausscheidung erfolgte, die sich rasch absetzte. 2 $\frac{1}{2}$ Stunden nach der Fällung decantirte ich fast ohne Verlust, da es sich ja nicht um einen quantitativen Versuch handelte, und filtrirte den Glykogenbrei durch ein schwedisches Filter. Die Filtration vollzog sich schnell, und das rothe Filtrat ist vollkommen klar. Nachdem die Flüssigkeit gut abgetropft war, wurde das Glykogen mit einer Flüssigkeit gewaschen, die eben so viel Kali und Alkohol enthielt wie die Glykogenlösung vor der Fällung. Auch diese Waschlösung filtrirte ziemlich schnell. Nach gutem Abtropfen wurde über das Abflussrohr des Trichters ein Gummischlauch gezogen, den ich mit einem Quetschhahn verschloss. Darauf goss ich kaltes, sterilisiertes Wasser auf den Trichter. In einer Stunde ist fast alles Glykogen gelöst. Die Glykogenlösung wird darauf nach Oeffnung des Quetschhahns in einen 500 ccm-Kolben filtrirt und sterilisiertes Wasser immer aufs Neue auf das Filter gegossen. Es hinterbleibt nur die Spur eines grünlichen Hauches auf dem Papier. Das zuletzt abfliessende Filtrat gibt mit Alkohol keine Trübung mehr. Die erhaltene Glykogenlösung zeigt starke Opalescenz. In zwei Reagensgläser wird je eine Probe der Lösung eingefüllt, angesäuert und mit Brücke'schem Reagens geprüft. Nicht die Spur einer Trübung!

Nicht einmal ein Unterschied der beiden Proben ist zu sehen, obwohl die eine mit Brücke's Reagens versetzt ist und die andere nicht.

Weil es sich bei diesen Versuchen um sehr kleine Unterschiede handelt, die, wie ich überzeugt bin, nur mit meiner Methode festgestellt werden können, habe ich ferner einige Vorsichtsmaassregeln angewandt, die ich genauer angeben will.

1. Zu jedem Versuche wurden 100 ccm Glykogenlösung aus immer derselben Bürette bei voll geöffnetem Hahne abgemessen, und zwar in derselben Stunde für alle Versuche.

2. Wenn man 100 ccm Glykogenlösung unmittelbar in einen 300 ccm-Kolben einfließen lässt, sofort mit ClH invertirt und den Zucker nach meiner Methode bestimmt, erfährt man den Gehalt an Kohlehydrat ganz genau. —

Wenn man aber die abgemessenen 100 ccm Glykogenlösung erst mit Alkohol fällt, das gefällte Glykogen abfiltrirt, dann wieder löst, invertirt und den Zucker bestimmt, müssen kleine Verluste eintreten, die nicht zu vermeiden sind. Diese Verluste sind wesentlich bedingt durch Spuren von Glykogen, welche durch die besten Filter gehen, durch nicht vollständige Fällbarkeit des Glykogenes durch den angewandten Weingeist, weil neben dem Glykogen ein wenig Glykogendextrin vorhanden sein kann, und endlich weil absolutes Auswaschen des Filters und der Gefässwände kaum zu erzielen ist. Bei sorgfältigstem Arbeiten pflegt der Verlust ein Milligramm selten zu übersteigen, wenn man es nur mit normalem Glykogen zu thun hat. — Man kann desshalb nur Versuche vergleichen, bei denen die Alkoholfällung entweder in Anwendung gezogen wurde oder ganz unterblieb.

3. Wenn man eine Glykogenlösung in 300 ccm 2,2% iger Salzsäure invertirt, so hat die Dauer des Kochens einen Einfluss auf die Menge des sich abscheidenden Kupferoxyduls. Denn bei länger als 3 bis 5 Stunden fortgesetzter Erhitzung nimmt die Ausbeute an Zucker ab. Wahrscheinlich hat auch die Höhe der Temperatur einen Einfluss. Ich habe desshalb, wenn es irgend möglich war, die beiden Flaschen, deren Glykogenlösungen zu vergleichen waren, gleichzeitig in demselben Wasserbad genau 3 Stunden lang erhitzt.

4. Bei der Bestimmung des Zuckers nach meiner gravimetrischen Methode hat man zu bedenken, dass die Ausbeute an Kupferoxydul abhängt sowohl von der Dauer der Erhitzung als auch von der Höhe der angewandten Temperatur. Das in demselben Kessel kochende Wasser hat aber aus verschiedenen Gründen nicht immer dieselbe Temperatur. Desshalb bringe ich in die beiden Bechergläser die **beiden verschiedenen Zuckerlösungen**, welche mit einander verglichen werden sollen, und erhitze sie in demselben Bade **gleichzeitig und gleich lange**.

Dadurch verliert man den Vorthail, welcher verbürgt wird, wenn in beiden Bechergläsern gleichzeitig **dieselbe Zuckerlösung** erhitzt wird. Denn die beiden Analysen müssen denselben Werth geben. Indem man sich dieses Vortheilcs begibt, muss man unbedingt für

das Kupferoxydul nur solche Asbestfilterröhrchen benutzen, welche durch häufige Prüfung als zuverlässig sich bewährt haben. Die Erfahrung hat mich aber belehrt, dass diese Röhrchen niemals als absolut dicht angesehen werden dürfen, so dass jedes, auch das beste, mit einem kleinen Fehler behaftet ist. Um nicht getäuscht zu werden, mache ich, wo es sich um sehr kleine Unterschiede handelt, deshalb 2 Doppelversuche so, dass im ersten Doppelversuch das der Zuckerlösung α entsprechende Kupferoxydul durch das Asbeströhrchen *A*, das der Zuckerlösung β entsprechende Kupferoxydul durch das Asbeströhrchen *B* filtrirt wird. — In dem zweiten Doppelversuch wird das der Zuckerlösung β entsprechende Kupferoxydul durch Asbestrohr *A*, das der Zuckerlösung α entsprechende Kupferoxydul durch das Asbestrohr *B* filtrirt. Die Mittel aus beiden *A*-Versuchen und *B*-Versuchen geben dann den richtigen Werth.

Ich habe bei diesen Versuchen die Controle nach Volhard nie versäumt. Sie hat sich als durchaus nothwendig ergeben, wo es sich um kleine Unterschiede handelt.

Versuch I.

Gehaltsbestimmung der Glykogenlösung.

100 ccm Glykogenlösung in ein 300 ccm-Kölbchen gemessen, 0,6 ccm ClH von 1,19 spec. Gew. zum Neutralisiren hinzugegeben + 15 ccm ClH von 1,19 + Wasser q. s. — Beim Auffüllen auf nahezu 300 ccm enthält die Lösung 2,2% ClH. — Nach vollzogener Invertirung ist die Flüssigkeit schwach gleichmässig getrübt. Sobald sie sich vollkommen abgekühlt hat, wird genau auf 300 ccm mit Wasser aufgefüllt und durch schwedisches Filter gegossen. Das Filtrat ist ganz klar und farblos.

81 ccm Zuckerlösung lieferten:

0,1977 g Cu_2O = 0,1756 Cu (Rohr 4).

Nach Volhard's Controle:

0,1753 Cu.

Es ist bemerkenswerth, dass vollkommene Uebereinstimmung zwischen der gravimetrischen und titrimetrischen Bestimmung besteht.

Also:

100 ccm Glykogenlösung = 0,3026 % Zucker.

Wiederholung des Versuches 1.

Gefunden:

$$0,1979 \text{ g Cu}_2\text{O} = 0,1757 \text{ Cu (Rohr 10).}$$

Nach Volhard's Controle:

$$0,1753 \text{ Cu.}$$

Die Wiederholung gibt denselben Werth, was für die Zuverlässigkeit der Röhren 4 und 10 bürgt.

Also:

$$100 \text{ ccm Glykogenlösung} = 0,3026 \% \text{ Zucker.}$$

Versuch II.

Glykogenlösung 15 Stunden in 2% Kalilauge gekocht.

100 ccm Lauge von 3,6% KOH im 200 ccm-Kölbchen zum Sieden erhitzt. Hinzugemessen 100 ccm Glykogenlösung. Da letztere eine kleine, bekannte Menge KOH bereits enthielt, hat man jetzt nahe 200 ccm Lösung von 2% KOH, die 15 Stunden im siedenden Wasserbad erhitzt werden. Hierauf im 200 ccm-Kölbchen mit ClH von 1,19 spec. Gew. neutralisirt. Uebergeführt in einen 300 ccm-Kolben, 15 ccm ClH von 1,19 spec. Gew. und Wasser fast bis zur Marke eingefüllt, so dass eine Lösung von 2,2% ClH vorliegt. Nach Invertirung abgekühlt, auf genau 300 ccm mit Wasser aufgefüllt, durch schwedisches Filter die etwas getrübbte Flüssigkeit gegossen. Das Filtrat ist klar und farblos.

81 ccm Zuckerlösung ergaben:

$$0,1986 \text{ Cu}_2\text{O} = 0,1763 \text{ Cu (Rohr 10).}$$

Die Controle nach Volhard:

$$0,1742 \text{ Cu.}$$

Also:

$$100 \text{ ccm Glykogenlösung} = 0,3006 \% \text{ Zucker.}$$

Die Wiederholung des Versuches.

81 ccm Zuckerlösung ergaben:

$$0,1993 \text{ Cu}_2\text{O} = 0,1769 \text{ Cu (Rohr 4).}$$

Die Controle nach Volhard:

$$0,1731 \text{ Cu.}$$

Also:

$$\text{Analyse I} = 0,1742 \text{ Cu,}$$

$$\text{„ II} = 0,1731 \text{ Cu,}$$

$$\text{Mittel} = 0,1736 \text{ Cu} = 0,0809 \% \text{ Zucker.}$$

Also:

100 ccm Glykogenlösung = 0,2996 g Zucker.

Folglich:

100 ccm Glykogenlösung vor Kochen mit Kali = 0,3026 Zucker

100 " " nach " " 2 % " = 0,2996 "

Absoluter Verlust = 0,0030 Zucker.

Verlust = 0,99 %.

Versuch III.

Alkoholfällung des Glykogenes:

100 ccm Glykogenlösung in's Becherglas + 200 ccm Wasser + 19,3 ccm Lauge von 60 %. Die Lösung enthält also annähernd 4 % KOH, wenn man beachtet, dass die Glykogenlösung selbst einen kleinen KOH-Gehalt hat. — Gefällt mit 320 ccm Alkohol von 96 % Tr., — nicht flockig, sondern gleichmässig milchig getrübt. — Allmählich setzt sich eine lockere, weiche, weisse, flockige Masse ab. Nur wenig klebt am Glase. Nach 2tägigem Stehen ganz klar, filtrirt auch klar. In 300 ccm-Kolben übergeführt und auf 2,2 % ClH gebracht. Nach Invertirung filtrirt.

81 ccm Zuckerlösung liefern:

0,1964 Cu₂O = 0,1744 Cu (Rohr 3).

Controle nach Volhard:

0,1723 Cu.

Wiederholung des Versuches.

81 ccm liefern:

0,1948 Cu₂O = 0,173 Cu (Rohr 12).

Controle nach Volhard:

0,1727.

Also:

Analyse I = 0,1723,

" II = 0,1727,

Mittel = 0,1725 = 0,0803 Zucker.

Also:

100 ccm Glykogenlösung = 0,2974 Zucker.

Versuch IV.

100 ccm Glykogenlösung in 200 ccm-Kölbchen mit 100 ccm Wasser + KOH versetzt, so dass die Lösung 2 % KOH hat.

15 Stunden erhitzt. Dann in's Becherglas gegossen, 100 ccm Wasser (Spülwasser) + so viel KOH hinzugefügt, dass die Lösung auf 4 % KOH gebracht wird. Gefällt mit einem gleichen Volum Alkohol von 96 % Tr. Abfiltrirt, im 300 ccm-Kolben invertirt; nach Abkühlung auf genau 300 ccm gebracht, filtrirt.

81 ccm Zucker liefern:

$$0,1916 \text{ Cu}_2\text{O} = \mathbf{0,1703 \text{ Cu}} \text{ (Rohr 12)}$$

Die Controle nach Volhard:

$$\mathbf{0,1691 \text{ Cu.}}$$

Wiederholung des Versuches.

81 ccm Zuckerlösung liefern:

$$0,1908 \text{ Cu}_2\text{O} = \mathbf{0,1694 \text{ Cu}} \text{ (Rohr 3).}$$

Die Controle nach Volhard:

$$\mathbf{0,1696 \text{ Cu.}}$$

Also:

Analyse I 0,1691 Cu,

„ II 0,1696 Cu,

$$0,1693 \text{ Cu} = 0,0787 \text{ Zucker.}$$

Also:

100 ccm Glykogenlösung **0,2915 g Zucker.**

Versuch III. Vor Kochen mit KOH = 0,2974 Zucker.

Versuch IV. Nach Kochen mit 2 % KOH = 0,2915 Zucker.

Absoluter Verlust = 0,0059 g Zucker.

Verlust 1,98 %.

(Siehe Tabelle auf S. 94.)

Die Reihe III hat wesentlich dieselben Ergebnisse geliefert wie Reihe I und II.

Diese Ergebnisse lassen sich in den Satz zusammenfassen, dass durch das viele Stunden fortgesetzte Kochen einer Glykogenlösung mit verdünnter Kalilauge der Gehalt an Kohlehydrat kaum geändert wird. Denn die Verluste schwankten von 0,37 % bis 1,35 %. —

Vergleicht man aber das durch Alkohol fällbare Glykogen vor und nach der Kalibehandlung, so steigt der Verlust auf 1,98 % bis 2,56 %.

Bei der gewöhnlichen Glykogenanalyse liegen diese Unterschiede im Bereiche der Beobachtungsfehler. Bei der Art, wie ich die Analyse angestellt habe, muss die Thatsache für bewiesen gelten, dass

Uebersicht zu Reihe III.

Versuche mit Glykogen, das ohne Säuren und mit Ausschluss der Brücke'schen Reagentien dargestellt worden ist. Die Menge des Glykogenes in 100 ccm Lösung ist als Zucker in Gramm angegeben.

Nr.	Vor Kochen mit Kali Gehalt an Glykogen		Nach 15-stündigem Kochen mit 2%iger Kalilauge Gehalt an Glykogen		Verlust an Glykogen durch Kochen mit 2%iger Kalilauge	Mittel
	bestimmt, ohne dass das Glykogen vor der Inversion mit Alkohol gefällt wurde	bestimmt, indem das Glykogen vor der Inversion mit Al- kohol gefällt wurde	bestimmt, ohne dass das Glykogen vor der Inversion mit Alkohol gefällt wurde	bestimmt, indem das Glykogen vor der Inversion mit Al- kohol gefällt wurde		
1.	0,3026 ‰ 0,3026 ‰	— —	— —	— —	— —	—
2.	— —	— —	0,3006 ‰ 0,2985 ‰	— —	0,66 ‰ 1,35 ‰	1,0 ‰
3.	— —	0,2974 ‰ 0,2974 ‰	— —	— —	— —	—
4.	— —	— —	— —	0,2911 ‰ 0,292 ‰	2,12 ‰ 1,82 ‰	1,97 ‰

das Kochen mit 2 % iger Kalilauge eine kleine Veränderung des Glykogenes bewirkte, die sich in grösserer Löslichkeit in Weingeist aussprach und wahrscheinlich auch mit der Zerstörung einer noch kleineren Menge sich verknüpfte. F. W. Pavy hat die Zerstörbarkeit des Amylodextrins durch Kalilauge dem Amylon gegenüber festgestellt und ist desshalb der Ansicht, dass auch Glykogendextrin sich ähnlich verhalte. Meine Versuche würden also erst dann streng beweisend sein, wenn festgestellt wäre, dass bei denselben eine geringe Dextrinbildung ausgeschlossen war.

Ich habe alle Vorsichtsmaassregeln so getroffen, um eine Dextrinbildung möglichst zu verhindern. Keine Säure ist mit meinem Glykogen vor der Invertirung in Berührung gekommen, alles angewandte Wasser war sterilisirt, die Glaswolle vor dem Gebrauch ausgekocht u. s. w. — Was ich nicht hindern konnte, war die über die ganze Nacht sich hinziehende Filtration durch die Glaswolle. Der grosse Reichthum an gelöstem Eiweiss könnte hier trotz der 15 % KOH vielleicht einen zu Fermentbildung geeigneten Boden geschaffen haben. Ich kann also mit Sicherheit den vollkommenen Ausschluss von Fermentwirkungen nicht behaupten.

Verfehlen will ich nicht, hervorzuheben, dass F. W. Pavy schon vor mir dieselbe Frage untersuchte und bemerkenswerter Weise Verluste von derselben Grösse wie ich beobachtete. Bei $\frac{1}{2}$ stündigem Kochen von Glykogen in Kalilauge von 10 % erhielt F. W. Pavy¹⁾ Verluste von 1,8 bis 2,4 %. Das Glykogen war mit der Kalimethode aus der Leber gewonnen worden. —

Trotz alledem sind Thatsachen vorhanden, welche sehr dafür sprechen, dass das normale Glykogen der Organe auch durch verdünnte Kalilauge von 1 bis 2 % nicht angegriffen wird.

Ich denke hier in erster Linie an mehrere in meinem Laboratorium von Dr. J. Nerking ausgeführte Reihen von Analysen.

In Reihe VI²⁾ kochte Er 250 ccm Fleischlösung von ungefähr 0,8 % KOH ein Mal 24 Stunden, dann 250 ccm derselben Fleischlösung 120 Stunden mit dem Ergebniss:

250 ccm Fleischlösung enthielt vor dem Kochen mit Kalilauge
0,3206 g Glykogen.

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

2) Dieses Archiv Bd. 81 S. 21 (1900).

250 ccm Fleischlösung nach 24 Stunden Kochen mit 0,8 %
Kalilauge 0,3182 g Glykogen.

250 ccm Fleischlösung nach 120 Stunden Kochen mit 0,8 %
Kalilauge 0,3206 g Glykogen.

Bei Nerking finden sich noch mehr, wenn auch weniger elegante Reihen, welche bezeugen, dass das in den Organen enthaltene Glykogen beliebig lang mit verdünnter Kalilauge erhitzt werden kann, ohne dass es eine Zersetzung erleidet.

Es darf nun allerdings nicht ausser Acht gelassen werden, dass die verdünnte Kalilauge bei der Analyse der Organe vielleicht nur scheinbar das Glykogen unversehrt lässt, weil das Eiweiss das Kali bindet und desshalb das Glykogen schützt. Ich werde diese Frage in meinem Laboratorium sofort weiter verfolgen lassen.

Wie aber auch immer die Wirkung der verdünnten Kalilauge auf Glykogen erklärt werden muss, so steht doch so viel fest, dass die hier vielleicht in Betracht kommenden Fehler sehr kleine sind gegen diejenigen, welche bei dem nach Brücke-Külz dargestellten Glykogene bisher beobachtet worden sind.

v. Vintschgau und Dietl¹⁾ fanden: „Wenn man Glykogen „durch längere Zeit (2 bis 3 Stunden) mit Kalilösung (von 1 % bis „3 %) erwärmt, so entsteht ein Verlust, der bis zu 11,7 % steigen „kann.“

Richard Külz²⁾ erhitzte Glykogen in 1 %iger Kalilösung 1 bis 2 Stunden und hatte Verluste von 4,88 bis 10,52 %. Er fällte jedes Mal nach dem Kochen die neutralisirte Lösung mit Alkohol und wog das Glykogen unter Berücksichtigung des Aschengehaltes.

F. W. Pavy hat auch dieser Frage sein Augenmerk zugewandt und kommt zu dem Ergebniss, dass das nach Brücke dargestellte Glykogen eine Veränderung erlitten hat, so dass es der siedenden Kalilauge nicht mehr widersteht. F. W. Pavy³⁾ beobachtete dann Verluste von 19,4 % und noch mehr.

Als ich⁴⁾ selbst die Versuche der genannten Forscher mit den von diesen angewandten Methoden wiederholte, aber das Kochen des Glykogenes in 2 %iger Kalilauge viel länger, nämlich 24 Stunden,

1) Dieses Archiv Bd. 13 S. 261.

2) Zeitschr. f. Biologie Bd. 22 S. 173.

3) F. W. Pavy, The Physiology of the Carbohydrates. An Epicriticism p. 98. London 1895.

4) Dieses Archiv Bd. 75 S. 163.

fortsetzte, stieg der Verlust auf 45 %. — Nach dem Kochen hatte auch ich mit verdünnter Salzsäure neutralisirt und dann mit 2¹/₂ Vol. Alkohol von 96 Vol.-Procent gefällt. —

In letzter Zeit habe ich diese Versuche mit Benutzung meiner neuen Methoden wiederholt, welche die durch Verunreinigungen bedingten Täuschungen ausschliessen. Bei viele Stunden andauernder Erhitzung des nach Brücke-Külz dargestellten Glykogenes in 2 %iger Kalilauge beobachtete ich einen Verlust von ungefähr 6 % an Kohlehydrat, gemessen durch die Reduction der Kupferoxydlösung. Bestimmte ich den Verlust, wie bisher gebräuchlich, durch Fällung mit zwei Volumina Alkohol von 96 % Tr., so wuchs der Verlust auf ca. 12 %. — Durch das Kochen mit verdünnter Kalilauge war also ein Theil des Glykogenes nur löslicher in Weingeist geworden — wohl durch Uebergang in Dextrin —, ein anderer Theil aber war als Kohlehydrat zerstört¹⁾.

Die hier mitgetheilten Thatsachen werden es wünschenswerth erscheinen lassen, dass für die quantitative Analyse des Glykogenes der Organe nicht verdünnte, sondern sehr starke Kalilauge von etwa 30 % in Anwendung kommt.

1) Dieses Archiv Bd. 92 S. 100.