

(Aus dem physiologischen Laboratorium in Bonn.)

Über die Berechtigung der Annahme, dass das Glykogen in den Organen chemisch gebunden sei.

Von

Hermann Loeschke.

§ 1. Kennzeichnung der Aufgabe.

In den letzten Jahren sind Tatsachen veröffentlicht worden, welche die Annahme zu begründen scheinen, dass das Glykogen in den Organen wenigstens teilweise in chemischer Bindung enthalten sei. Unserer Meinung nach lässt sich ein strenger Beweis gegen diese Auffassung heutigen Tages nicht beibringen; denn es ist unmöglich, das Glykogen ohne Reagentien zu isolieren, welche möglicherweise die vorhandene chemische Bindung zerlegen.

Es kann deshalb nur die Aufgabe sein, zu untersuchen, ob diejenigen Gründe, die bis jetzt für die chemische Bindung des Glykogens beigebracht worden sind, anerkannt werden müssen oder nicht.

Das schwächste Reagens, mit dem man das Glykogen aus den Organen zu gewinnen versucht hat, ist das kalte Wasser. Bei derartigen Versuchen zeigte sich, dass nur ein geringer Bruchteil des vorhandenen Glykogenes sich ausziehen liess, selbst wenn man das Organ fein zerkleinerte, um dem Wasser grössere Angriffsflächen zu bieten. Bedeutend höhere Werte erzielte man¹⁾, wenn man die Zerkleinerung dadurch vervollständigte, dass man den Organbrei gefrieren liess und dadurch eine Sprengung der Zellen und Zellkomplexe bewirkte. Auch bei diesen Versuchen blieb aber eine nicht unbeträchtliche Menge Glykogen in den Organen zurück. Wäre aber auch die vollständige Gewinnung auf diese Weise möglich, so bliebe die Schwierigkeit, aus dem wässrigen Auszug, der auch Eiweiss und viele andere Stoffe enthält, das Glykogen so zu isolieren, dass eine chemische Einwirkung sicher ausgeschlossen bleibt.

1) W. Saake, Zeitschr. f. Biol. Bd. 29 S. 459 ff.

Man versuchte, das Glykogen mit heissem Wasser, durch längeres Kochen, auszuziehen. Man kochte bis zu 18 Tagen¹⁾, und es zeigte sich, dass man trotzdem nur einen Teil des vorhandenen Glykogens erhielt, dessen Grösse zwischen 25 und 75 % des Gesamtglykogens schwankte. Ähnliche Werte gab die Behandlung mit Trichloressigsäure²⁾. Der Rest des Glykogens war nur zu erhalten durch Auflösung des Organrückstandes in Kalilauge.

Auch mit verdünnter Kalilauge lässt sich, wie eine von J. Nerking³⁾ veröffentlichte Reihe von Versuchen zu beweisen scheint, nur unter Umständen und bei sehr langem Kochen alles Glykogen abspalten, und dabei wäre infolge einer gleichzeitigen Zersetzung des gelösten Glykogens auch keine quantitative Glykogenbestimmung möglich. So glaubt wenigstens Nerking seine Versuche erklären zu müssen, bei denen er durch längeres Kochen mit sehr verdünnter Kalilauge teils mehr, teils weniger Glykogen findet, als wenn er das Organ nur bis zur Lösung kocht.

Ein schönerer Beweis für chemische und gegen mechanische Bindung als eine derartige Glykogenvermehrung bei längerem Erhitzen des schon gelösten Eiweisses, lässt sich wohl kaum denken. Und trotzdem erhoben sich, allerdings ohne Beweis des Gegenteils, Stimmen, die die Hypothese eines gebundenen Glykogens auch durch die Nerking'schen Versuche nicht genügend begründet fanden [Cremer⁴⁾, Salkowski⁵⁾].

Deshalb veranlasste mich Herr Professor Pflüger, in seinem Laboratorium weitere Versuche in dieser Richtung zu machen.

§ 2. Wenn aus einer Organlösung das freie Glykogen nach Nerking ausgefällt ist, soll festgestellt werden, ob in dem Filtrat hiervon noch mehr Glykogen durch Aufschliessung gewonnen werden kann.

Wenn ein gebundenes Glykogen im Sinne Nerking's existiert, so muss es sich nach Ausfällen des freien

1) J. Nerking, Pflüger's Arch. Bd. 81 S. 637.

2) S. Fränkel, Pflüger's Arch. Bd. 52. S. 125 ff. — J. Weidenbaum, Pflüger's Arch. Bd. 54. S. 319 ff.

3) Pflüger's Arch. Bd. 81. 1900. S. 8 ff.

4) M. Cremer, Ergebnisse der Physiologie 1902 Abt. I S. 861.

5) E. Salkowski, Zeitschr. f. physiol. Chemie Bd. 37 S. 455.

Glykogens durch Alkohol noch in der alkalisch-alkoholischen Eiweisslösung befinden und mit dieser beim Abfiltrieren des Glykogenniederschlags durchs Filter gehen. Dann muss es sich aber auch aus dem Filtrat wieder gewinnen lassen.

Es wurden zu diesem Zwecke Kalbslebern nach Nerking durch längeres Kochen mit KOH 1 % gelöst. Das Ausfällen des freien Glykogens geschah teils nach Nerking durch Erhöhung der Alkaleszenz der Lösungen auf KOH 3 % und Zusatz von 10 g JK und 50 ccm Alkohol 96 % auf je 100 ccm der Lösung, teils nach Pflüger durch Fällern mit 1 Vol. Alkohol 96 % auf 1 Vol. Organlösung, die 15 % KOH enthält. Das so ausgefällte Glykogen wurde auf einem schwedischen Filter abfiltriert.

Um nicht durch eventuell die Poren des Filters durchsetzende Partikelchen des schon gefällten Glykogenes getäuscht zu werden, wurden alle Filtrate vor der Weiterbehandlung nochmals filtriert und nur absolut klare Filtrate verwendet. Die zum Auswaschen des Filters benutzte Waschlösung wurde gesondert aufgefangen; sie kommt daher bei diesen Filtratuntersuchungen nicht in Betracht. Das auf beschriebene Weise erhaltene alkoholische Filtrat der Organlösung wurde in offener Glasschale auf dem Wasserbade so lange erhitzt, bis kein Alkoholgeruch mehr wahrnehmbar war. Dann wurde teils durch längeres Kochen dieser verdünnten Lösung, teils durch 2—3stündiges Kochen in KOH 30 % versucht, das hypothetische „gebundene“ Glykogen abzuspalten. Nach dem Kochen wurde mit einem oder mehr Volumina Alkohol 96 % ausgefällt. Meist trat eine schwache Trübung ein, die sich teils als feiner Staub, teils als kleine Flöckchen meist sehr langsam senkte. Auf dem Boden und an den Wänden des Glases setzte sich der Körper als klebrige Masse fest. Er wurde abfiltriert und in Wasser gelöst. Die wässrige Lösung gab in einem der 12 untersuchten Fälle eine sehr schwache und unsichere Jodreaktion; in allen anderen Fällen war keine Spur davon zu sehen. Das beweist allerdings nicht, dass der Stoff auch im chemisch reinen Zustand keine Jodreaktion gegeben hätte; denn in dem mit der Kalimethode aus Lebern gewonnenen Rohglykogen findet sich sehr häufig ein Stoff, der Jodlösung entfärbt und daher eine Glykogenreaktion verdecken könnte.

In neun Fällen zeigte der Stoff nach Inversion mit HCl das Vermögen, Fehling'sche Lösung zu reduzieren. Von diesen waren

fünf das Resultat aus Fällungen mit JK und $\frac{1}{2}$ Vol. Alkohol 96 %, auf die ich noch zurückkomme; in einem sechsten Falle war das Filtrat von vornherein trüb; die drei letzten, die von Fällungen mit 1 Vol. Alkohol 96 aus KOH 15 % stammten, wiesen nur äusserst geringe Reduktionsfähigkeit auf; und bei den drei übrigen Fällungen dieser Art fehlte überhaupt jedes Kohlehydrat. Quantitative Bestimmungen dieses Körpers, der wohl mit dem von Vintschgau und Dietl¹⁾ beschriebenen β -Glykogendextrin identisch ist, glückten nur zweimal nach Fällung der Hauptmasse des Glykogens mit JK und $\frac{1}{2}$ Vol. Alkohol 96 %, doch waren die dabei erhaltenen Werte so gering, dass sie keineswegs die Nerking'sche Theorie zu stützen vermögen, sondern, wie später bewiesen werden soll, anders zu erklären sind. Es scheint vielmehr der negative Ausfall dieser Versuchsreihe ganz entschieden gegen die Annahme eines gebundenen Glykogens zu sprechen.

Hier mögen einige Bedenken Platz finden, die sich an die Verwendung der Nerking'schen Jodkalimethode bei der quantitativen Glykogenbestimmung knüpfen und gleichzeitig die Erklärung geben für die Mengen reduzierender Substanz, die aus den Filtraten gewonnen werden konnten. Herr Professor Pflüger machte mich darauf aufmerksam, dass er beobachtet habe, wie das gefällte Glykogen sich beim Auswaschen mit der Nerking'schen Waschlösung teilweise wieder auflöse. Es sind in der Eiweisslösung scheinbar Stoffe, die die Fällung begünstigen, und bei deren Wegfall $\frac{1}{2}$ Vol. Alkohol 96 % zur vollständigen Ausfällung nicht immer mehr genügt. Infolgedessen wurde das Glykogen bei all unseren Versuchen, wo die Fällung mit JK und $\frac{1}{2}$ Vol. Alkohol 96 % Verwendung fand, nicht mit der Waschlösung, sondern nur noch mit salzhaltigem Alkohol 66 % und 96 % gewaschen. Bei einer Reihe von Versuchen wurde überhaupt die Fällung mit JK vermieden; vielmehr wurden die Lösungen durch Zusatz konzentrierter Kalilauge auf KOH 15 % gebracht und nach Pflüger mit dem gleichen Volum Alkohol 96 % gefällt. Zum Auswaschen wurde bei diesen Versuchen die Pflüger'sche Waschlösung: 1 Vol. KOH 15 % + 2 Vol. Alkohol 96 % verwendet. Bei einer Reihe von Analysen wurden Parallelversuche gemacht, indem Portionen derselben Organlösungen gleichzeitig nach den beiden eben besprochenen Methoden behandelt

1) Pflüger's Arch. Bd. 17 S. 159 ff.

wurden. Dabei zeigte sich, dass bei Verwendung der Jodkalimethode, d. h. bei Fällung mit $\frac{1}{2}$ Vol. Alkohol 96 %, häufig und ganz besonders bei längerer Kaliwirkung ein Teil des Glykogens beim Ausfällen in Lösung bleibt und für die Analyse verloren geht. Die Alkohol-löslichkeit des Glykogens nimmt zu bei längerem Kochen mit verdünnter KOH-Lauge.

Es würde das den von Pflüger¹⁾ gemachten Beobachtungen entsprechen, wonach bei 15—20stündigem Kochen reiner Glykogenlösungen in verdünnter KOH-Lauge eine Zunahme der Alkohol-löslichkeit auftritt; nur würden die Verluste sich erhöhen, da einmal bei der Jodkalimethode nur $\frac{1}{2}$ Vol. Alkohol 96 % zum Ausfällen verwendet wird, und da andererseits die Kochdauer nicht, wie bei Pflüger, 15—20 Stunden, sondern bis zu 150 Stunden betrug.

Es folgen zum Belege die Versuche. Die analytischen Zahlen zu diesen Versuchen folgen später. Das Glykogen wurde mit der Pflüger'schen Cu_2O -Methode als Zucker bestimmt.

I. Bei elfstündigem Kochen einer Hundeleber mit verdünnter Kalilauge ergab sich:

Bei Fällung mit

1 Vol. Alkohol 96 % aus KOH 15 % 9,87 % Zucker
 $\frac{1}{2}$ " " 96 % + 10 % JK aus KOH 3 % . 9,66 % "

Der Verlust betrug also bei elfstündigem Kochen 2,1 % des Gesamtglykogens.

II. Hundeleber.

Fällungsmethode	bei 2 Stunden Kochen	bei 24 Stunden Kochen	bei 120 Stunden Kochen	bei 130 Stunden Kochen
1 Vol. Alkohol 1 Vol. Organlösung mit 15 % KOH	16,167 % Zu^+	14,980 % Zu^+	15,129 % Zu^+	14,610 % Zu^+
$\frac{1}{2}$ Vol. Alkohol 1 Vol. Organlösung mit 10 % JK + 3 % KOH	15,944 % Zu^+	14,498 % Zu^+	14,313 % Zu^+	13,720 % Zu^+
Unterschied beider Me- thoden in %	1,37 %	3,22 %	5,4 %	6,1 %
Absolute Differenz in Cu_2O	5,5 mg	13 mg	20 mg	22 mg

Wie die beiden Versuche beweisen, nimmt die Alkohol-löslichkeit des Glykogenes bei längerem Kochen mit KOH stetig zu:

1) Pflüger's Arch. Bd. 93 S. 77 ff.

Dauer des Kochens . . 2 St. 11 St. 24 St. 120 St. 130 St.
Verlust bei der Jodkali-

methode in Prozenten. 1,3 2,1 3,22 5,4 6,1

Der Verlust wird schliesslich so beträchtlich, dass die Jodkalimethode in Versuchen, die längere Kochdauer bedingen, vermieden werden muss.

Dieses löslicher gewordene und auch sonst wohl modifizierte Glykogen ist jedenfalls identisch mit der in den beschriebenen Versuchen aus den Filtraten gewonnenen reduzierenden Substanz. In $\frac{1}{2}$ Vol. Alkohl, wie es bei der Jodkalimethode Verwendung findet, war es löslich, während es aus den Filtraten mit einem oder mehr Vol. Alkohol 96 % wenigstens teilweise wieder ausgefällt werden konnte. Dafür spricht auch der Umstand, dass sich aus den Filtraten auch ohne längeres Kochen durch 2–10 Vol. Alkohol fast jedesmal geringe Mengen nach Inversion reduzierender Substanz niederschlagen liessen.

Hierhin gehören auch die zwei Fälle, in denen sich die aus den Filtraten gewonnene Substanz quantitativ bestimmen liess. In dem einen Falle wurde eine Kalbsleber fein zermahlen und 200 g Organbrei mit 400 ccm KOH 2 % 14 Stunden bis zur Lösung im siedenden Wasserbade erhitzt, dann auf 600 ccm aufgefüllt und filtriert. 100 ccm dieser Organlösung wurden auf KOH 3 % gebracht und mit 10 g JK und 50 ccm Alkohol 96 % versetzt. Die Glykogenfällung wurde auf einem schwedischen Filter abfiltriert. Das dabei erhaltene Filtrat war absolut klar, wurde aber trotzdem noch einmal durch ein schwedisches Filter gegossen. 100 ccm dieses alkoholischen Filtrats (entsprechend 66,67 ccm der Organlösung) wurden in offener Glasschale auf dem Wasserbade erhitzt, bis kein Alkohol mehr durch den Geruch wahrnehmbar war, dann durch Zusatz von konc. Kalilauge und Auffüllen mit Wasser auf 100 ccm KOH 30 % gebracht und zwei Stunden auf dem siedenden Wasserbade in einer Kochflasche erhitzt. Dann wurde auf 200 ccm aufgefüllt und 100 ccm dieser 15 %-igen KOH-Lösung mit 100 ccm Alkohol 96 % versetzt. Ein feiner Niederschlag senkt sich langsam, wird abfiltriert, in Wasser gelöst, mit 10 ccm HCl 2,2 % versetzt und in 200 ccm invertiert.

81 ccm ergaben: A. 4,5 mg Cu_2O ,

B. 3,5 mg Cu_2O ,

also einen ganz minimalen Betrag.

Interessanter ist der andere Fall, da bei ihm auch die entsprechende Glykogenanalyse ausgeführt wurde. 200 g einer Hundeleber wurden in 400 ccm siedender Kalilauge von 2 % eingetragen. Da in sechs Stunden noch keine Lösung eingetreten war, wurden noch 100 ccm KOH 2 % zugesetzt. In acht Stunden war das Organ gelöst. Es wurde auf 800 ccm aufgefüllt und durch Papier filtriert. 100 ccm des Filtrats wurden auf KOH 3 % gebracht und mit 10 g JK und 50 ccm Alkohol 96 % versetzt. Das gefällte Glykogen wurde abfiltriert, mit Alkohol 66 % + NaCl, dann mit Alkohol 96 % gewaschen, in H_2O gelöst und nach Zusatz von 25 ccm HCl 2,2 % in 500 ccm invertiert.

Die Analyse ergab 10,96 % Zucker.

Eine Analyse desselben Organs nach Pflüger's Methode durch zweistündiges Kochen mit KOH 30 % und Ausfällen aus KOH 15 % mit 1 Vol. Alkohol 96 % hatte ergeben:

12,88 % Zucker.

Von der doppelt filtrierten Lösung des ersten Versuches wurden 75 ccm aufgefangen, der Alkohol abgedunstet, der Rest auf 50 ccm KOH 15 % aufgefüllt, zwei Stunden gekocht und dann mit 50 ccm Alkohol 96 % versetzt. Die geringe flockige Ausscheidung wurde abfiltriert, in Wasser gelöst und nach Zusatz von 5 ccm HCl 2,2 % in 100 invertiert.

81 ccm ergaben 42 mg Cu_2O = 14 mg Zucker; also in 100 ccm Zuckerlösung, entsprechend 50 ccm Organlösung, 17,3 mg Zucker; also in 400 Organlösung, entsprechend 100 g Organ, 138,4 mg Zucker, also im Filtrat 0,1384 % Zucker, auf das Organ bezogen.

Addiert zu dem gefundenen Wert:

10,96 % Zucker,

+ 0,14 % Zucker,

11,10 % : 12,88 % bei Methode Pflüger.

Der Wert erreicht den bei zweistündigem Kochen mit konzentrierter KOH erhaltenen nicht.

Wenn man die Nerking'sche Theorie einer gleichzeitigen Zerstörung freien und Abspaltung gebundenen Glykogens annimmt, so musste man nach der hier angewendeten Methode die höchsten Glykogenwerte erzielen; denn das freie Glykogen wurde ja hier durch Ausfällen der zerstörenden Kaliwirkung entzogen, während das gebundene der abspaltenden Kaliwirkung weiter ausgesetzt wurde. Statt dessen

reicht die aus dem Filtrat wiedergewonnene Menge reduzierender Substanz nicht einmal aus, den bei achtstündigem Kochen und Fällung mit JK und $\frac{1}{2}$ Vol. Alkohol zu erwartenden Verlust zu decken, viel weniger, die Theorie eines gebundenen Glykogenes zu stützen; denn nach den vorhin mitgeteilten Versuchen würde man annehmen müssen, dass nach achtstündigem Kochen infolge der grösseren Alkohollöslichkeit fast 2 % des vorhandenen Glykogens in das Filtrat übergegangen wären. Eine geringe Zerstörung durch Kaliwirkung und Verluste beim Arbeiten mit so kleinen Mengen sind zwar anzunehmen, da der gefundene Wert aber nur 1,25 % der Gesamtmenge des Glykogens beträgt, so wird es selbst bei Annahme grösserer Verluste noch durch das infolge längeren Kochens mit Kali löslicher gewordene Glykogen erklärt. Da aber dieser Wert das Maximum aller aus den Filtraten gewonnenen Mengen reduzierender Substanz war, so muss man annehmen, dass in den Filtraten keine weitere Abspaltung gebundenen Glykogens stattgefunden hat. Denn, dass das gebundene Glykogen bei Weiterbehandlung des Filtrats vollständig zerstört werden sollte, ist nicht wahrscheinlich, da das alkohollöslichere Glykogen alle Manipulationen wenigstens teilweise überstanden hat. Ebenso wenig kann man annehmen, dass es tatsächlich vorhanden war und nur der Versuch der Abspaltung misslungen ist.

Auf Grund des bisher Gefundenen können wir zur kritischen Betrachtung zweier Versuche der Nerking'schen Arbeit übergehen, in denen es ihm „gelingen ist, aus dem Filtrat der ersten Glykogenfällung ein zweites Mal Glykogen niederzuschlagen“. Es sind die Reihe III_E und VIII (Pflüger's Arch. Bd. 81 S. 17 u. S. 24).

In Reihe III liess Nerking die alkalische Organlösung fünf Wochen stehen, in Reihe VIII zwei Tage. Es hatten sich also in beiden Fällen nicht unbedeutende Mengen dieses eben besprochenen in Alkohol löslicheren Glykogens gebildet, die vielleicht beim Ausfällen mit $\frac{1}{2}$ Vol. Alk. noch mitgefällt wurden, die sich aber, sobald an Stelle der Organlösung die Waschlösung trat, wieder auflösten und so ins Filtrat übergingen. Dass Nerking sie dort nicht als Fällung beobachtet hat, liegt daran, dass bei Zutritt des zum Waschen benutzen konzentrierteren Alkohols regelmässig im alkalischen Filtrat Salze gefällt werden, die, auch wenn kein Glykogen vorhanden ist, eine Trübung bedingen. Nerking giebt an, dass er sich bei den Versuchen in einer zweiten Probe überzeugt habe, dass in dem Filtrat

kein Glykogen mehr zu fällen war. Das ist ganz richtig, denn es ist fast sicher, dass er bei diesen Proben, wo es ihm bloss auf die Filtrate ankam, das gefällte Glykogen überhaupt nicht ausgewaschen hat und daher das erst durch die Waschlösung wieder gelöste Glykogen in den Kontrollproben nicht finden konnte, während er es in seinen Versuchen aus den die Fällbarkeit erhöhenden Organlösungen wieder mit $\frac{1}{2}$ Volum Alkohol 96 % ausfällen konnte. Des längeren Kochens hätte es dazu gar nicht bedurft. — Es sind aber noch andere Deutungen möglich, welche die Beweiskraft dieser Versuche beseitigen. Die beiden Versuche lassen sich also auch ohne die Annahme gebundenen Glykogens erklären.

Im übrigen stehen noch unaufgeklärt und scheinbar in direktem Widerspruch auf der einen Seite die Versuche Nerking's, in denen er nach Lösung des Organs bei längerem Kochen der Glykogen-Eiweislösung eine beträchtliche Vermehrung der Ausbeute an Glykogen erhält, auf der anderen Seite die eben besprochenen Versuche, in denen aus nach Nerking hergestellten Organlösungen nach Ausfällen des freien Glykogenes durch längeres Kochen kein Glykogen mehr gewonnen werden konnte.

§ 3. Wiederholung von Nerking's Versuchen.

Es war nun meine Aufgabe, Versuche nach dem Plane Nerking's anzustellen, aber die Fehler desselben zu vermeiden. Da Nerking weitaus die grössten Differenzen bei Verarbeitung von Lebern fand, so wurden in den folgenden Versuchen ausschliesslich Lebern verwendet. Da die zu den Filtratuntersuchungen meist verwendeten Kalbs- und Ochsenlebern bisweilen einen recht geringen Glykogengehalt aufwiesen, wurden die Versuche meist mit Hunden gemacht, die durch reichliche Fütterung mit Fleisch- und Kohlehydraten auf Glykogen gemästet worden waren. In einem Falle wurde auch ein gemästetes Kaninchen verwendet. Die Verwendung dieser Versuchstiere hatte auch den Vorteil, dass die Lebern sofort nach dem Tode des Tieres verarbeitet und dadurch jede postmortale Zersetzung vermieden werden konnte. Als konzentrierte KOH-Lösung wurde nicht nach Nerking KOH 10 %, sondern nach der von Pflüger ausgearbeiteten Methode der Glykogenbestimmung¹⁾ KOH

1) Pflüger's Arch. Bd. 93 S. 163 ff.

30 % benutzt. Beim Arbeiten mit verdünnter KOH-Lösung wurden nach Nerking 4 g KOH auf 100 g Organ gerechnet, aber die 100 g Organ meist nicht in 500, sondern in 300 ccm gelöst, um die mit dem Arbeiten in verdünnten Lösungen leicht verbundenen Fehlerquellen zu vermeiden. Die Konzentration der Lauge bildete also statt 0,8 bei diesen Versuchen 1,3 %. Eine Ausnahme davon bildete Vers. 6 (Hund 6,8 kg), wo mit einer 0,5 % igen Lösung gearbeitet wurde. Aus verdünnten Kalilaugen wurde das Glykogen teils nach Nerking aus KOH 3 % nach Zusatz von 10 g JK auf 100 Lösung mit $\frac{1}{2}$ Vol. Alkohol 96 %, teils aus KOH 15 % ohne JK mit 1 Vol. Alk. 96 % gefällt. Zum Auswaschen wurde im ersten Falle nicht die Nerking'sche JK-haltige Waschlösung, sondern aus schon besprochenen Gründen nur salzhaltiger Alk. 66 % und dann 96 % gebraucht. Bei den aus KOH 15 % gefällten Präparaten wurden die Pflüger'sche Waschlösung und Alk. 96 % verwendet.

Gekocht wurde mit KOH 30 %: 2 Stunden

mit verd. KOH: a) bis zur Lösung,

b) ca. 120 Stunden.

Nach dem Kochen wurden die Lösungen filtriert, und zwar die mit KOH 30 % behandelten immer durch dichte Glaswolle. Von den übrigen wurden die Lösungen in Vers. 1, 2 und 3 durch Papier filtriert. Da diese Art der Filtration sehr lange Zeit in Anspruch nahm und auch andere Bedenken hatte, wurde in den übrigen Versuchen davon abgesehen und durch dichte Glaswolle filtriert.

Das Resultat der Versuche giebt die auf S. 602 folgende Tabelle.

Das Hauptergebnis der Tabelle liegt in der Thatsache, dass die Ausbeute an Glykogen bei der Verlängerung des Kochens mit verdünnter Kalilauge nicht zu-, sondern **abnimmt** und zwar meist recht erheblich (vergl. die Stäbe 5, 6, 7, 8). Nerking fand, dass auch bei seinen Versuchen längeres Kochen zuweilen einen Verlust bedingte; doch beobachtete er hierbei auch umgekehrt eine Vermehrung der Ausbeute. Man könnte nun vermuten, dass in meinen Versuchen zufällig nur die den Verlust veranlassenden Bedingungen erfüllt waren, die auch bei Nerking vorkamen. Demgegenüber ist aber daran festzuhalten, dass die Verluste in meinen Versuchen so grosse sind, dass sie ausnahmslos auftreten, und dass später die Erklärung für die Nerking'schen Ergebnisse mitgeteilt werden wird, welche die Irrigkeit von dessen Ansichten über gebundenes Glykogen beweist.

1	2	I		II		III		9
		3	4	5	6	7	8	
Nr.	Lösungs- methode	Das Organ wird in 30% Kali- lauge gelöst		Das Organ bis zur Lösung in verdünnter Kalilauge erhitzt		Das Organ in verdünnter Kali- lauge sehr lange erhitzt		Grösster Verlust in %
	Fällungs- methode	{ 1 Vol. Organ- lösung mit 15% KOH + 1 Vol. Alkohol von 96 % Tr.	{ 1 Vol. Organ- lösung mit 3% KOH u. 10 % JK + 1/2 Vol. Al- kohol von 96% Tr.	{ 1 Vol. Organ- lösung mit 15% KOH + 1 Vol. Alkohol von 96 % Tr.	{ 1 Vol. Organ- lösung mit 3% KOH u. 10 % JK + 1/2 Vol. Alkohol von 96 % Tr.	{ 1 Vol. Organ- lösung mit 15% KOH + 1 Vol. Alkohol von 96 % Tr.	{ 1 Vol. Organ- lösung mit 3 % KOH u. 10% JK + 1/2 Vol. Al- kohol von 96 % Tr.	
1	Kaninchen	—	—	—	2 St. 6,455	—	120 St. 4,941	23,5
2	Hund 11 kg	2 St. 10,044	—	11 St. 9,87	11 St. 9,60	130 St. 6,30	—	37,3
3	Hund 5 kg	2 St. 12,84	—	—	8 St. 10,96	—	120 St. 10,64	17,1
4	Hund 63,5 kg	3 St. 5,68	—	—	—	150 St. 4,32	—	23,9
5	Hund 12 kg	2 St. 8,851	—	2 1/2 St. 8,509	—	—	—	0,84
6	Hund 6,8 kg	2 St. 17,48	2 St. 17,20	24 St. 16,12	24 St. 15,62	120 St. 16,32 130 St. 15,76	120 St. 15,44 136 St. 14,80	11,7 15,4

Die Werte als Zucker in % berechnet. Die Zahlen links oben geben die Kochdauer in Stunden („St.“) an.

Sehr bemerkenswert ist auch (vergl. Stab 3 und 5), dass die Ausbeute an Glykogen grösser ist bei Anwendung konzentrierter Lauge als bei verdünnter. Das ist aber nicht im Sinne einer Aufschliessung gebundenen Glykogens zu deuten, sondern darin begründet, dass die verdünnte Lauge das Glykogen löslicher in Alkohol macht und es teilweise als Glykogen zerstört. Weil also die konzentrierte Lauge keinen Verlust bedingt, liefert sie mehr. Es ist noch ein Punkt hierbei im Spiele, der in der Folge durch besondere Untersuchung klargelegt werden soll.

Es wird zweckmässig sein, die einzelnen Versuche, deren Ergebnisse soeben besprochen wurden, nunmehr genauer mitzuteilen.

Versuch I.

Ein kräftiges Kaninchen wurde fünf Tage hindurch gut gefüttert. Die Leber wurde rasch herausgenommen, von Gallenblase und grösseren Gefässen befreit und gewogen. Gewicht 92 g. Die ganze Leber wurde mit der Schere fein zerschnitten und in 184 ccm siedender Kalilauge von 2 % eingetragen, 5 Minuten über freier Flamme, dann im Wasserbad bis zur Lösung zwei Stunden gekocht, dann durch Papier filtriert und auf 200 ccm aufgefüllt. Davon wurden 100 ccm abgegossen; die bleibenden 100 ccm wurden 120 Stunden weitergekocht.

I. Kochdauer zwei Stunden.

100 ccm Organlösung auf KOH 3 % gebracht
+ 10 g JK + 50 ccm Alkohol 96 %.

Das gefällte Glykogen setzt sich ab, wird dann abfiltriert, das Filter gewaschen mit Alkohol 66 % + NaCl, dann Alkohol 96 %. Das Glykogen wird auf dem Filter in destilliertem Wasser gelöst und nach Zusatz von 50 ccm HCl 2,2 % in 1000 ccm invertiert.

Die Analyse ergab: 81 ccm = 0,5185 g Cu₂O
= 0,5100 g Cu₂O
Mittel = 0,51425 g Cu₂O
= 0,2405 g Zucker.

Das Organ enthielt: = 6,455 % ⁺Zu
oder 5,984 % Glykogen.

Das Filtrat von I ist ganz klar. Bei Zusatz von 250 ccm Alkohol 96 % zu 50 ccm Filtrat fällt ein feiner Niederschlag aus,

der, in Wasser gelöst und mit HCl invertiert, Fehling'sche Lösung reduziert. Quantitativ nicht bestimmbar.

75 ccm des Filtrats werden auf 50 ccm abgedunstet und in demselben Wasserbad wie die zweiten 100 ccm Organlösung 120 Stunden weitergekocht. Sie werden auf KOH 15 % gebracht und mit 1 Vol. Alkohol 96 % versetzt. Es tritt Trübung ein, die, abfiltriert, im Wasser gelöst und invertiert, ein sehr schwaches Reduktionsvermögen zeigt.

II. Von der 120 Stunden weitergekochten, auf 100 ccm aufgefüllten Organlösung werden 50 ccm auf KOH 3 % gebracht, mit 5 g JK und 30 ccm Alkohol 96 % versetzt. Die Fällung setzt sich ab, wird abfiltriert, gewaschen, in H_2O gelöst, invertiert in 500 ccm

$$\begin{aligned} \text{Die Analyse ergab: } 81 \text{ ccm} &= 0,4200 \text{ g Cu}_2\text{O} \\ &= 0,4110 \text{ g Cu}_2\text{O} \\ \text{Mittel} &= 0,4145 \text{ g Cu}_2\text{O} \\ &= 0,1841 \text{ g Zu.}^+ \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Das Organ enthielt:} &= 4,941 \% \text{ Zucker} \\ &\text{oder } 4,580 \% \text{ Glykogen.} \end{aligned}$$

Es ist also ein Verlust von 23,4 % eingetreten.

Versuch II.

Eine Hündin (während der Laktation) wird sechs Tage mit Fleisch und Kohlehydraten reichlich gefüttert.

Gewicht vor der Mästung . . .	9500 g
„ nach sechs Tagen . . .	11200 g
„ der Leber	453 g.

I. Mit konzentrierter Lauge gekocht (Stab 3 der Tabelle Versuch 2). 2×50 g Leber + 50 ccm KOH 60 % im siedenden Wasserbade erhitzt: $2\frac{1}{2}$ Stunden. Durch Glaswolle filtriert, auf 200 ccm aufgefüllt.

Je 100 ccm + 100 ccm Alkohol 96 %. Eine starke Fällung setzt sich ab, welche abfiltriert, gewaschen, gelöst und in 500 ccm invertiert wird.

$$\begin{aligned} \text{Die Analyse ergab: } 50 \text{ ccm} &= 0,5315 \text{ g Cu}_2\text{O} \\ &= 0,2511 \text{ g Zu.}^+ \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Das Organ enthielt:} &= 10,044 \% \text{ Zucker} \\ &\text{oder } 9,311 \% \text{ Glykogen.} \end{aligned}$$

II. Mit verdünnter Lauge gekocht (Stab 5 und 7 der Tabelle Versuch 2). $2 \times (100 \text{ g Leber} + 200 \text{ ccm KOH } 2\%)$ in siedendem Wasserbade erhitzt. Nach elf Stunden Lösung. Auf 300 ccm aufgefüllt und durch Papier filtriert.

A₁. 100 ccm auf KOH 15 % gebracht + 100 ccm Alkohol 96 %; sehr beträchtliche Fällung setzt sich ab, wird abfiltriert, gewaschen, gelöst und invertiert in 500 ccm.

Die Analyse ergab: 25 ccm Zu^+ -Lösung = 0,3765 g Cu₂O
= 0,1645 g Zu^+ .

Das Organ enthielt: = 9,87 % Zucker
oder 9,049 % Glykogen.

A₂. 50 ccm Organlösung weitergekocht, 130 Stunden, auf KOH 15 % gebracht und auf 100 ccm aufgefüllt, 100 ccm + 100 ccm Alkohol 96 %; Fällung setzt sich ab, wird abfiltriert, gewaschen, gelöst und invertiert in 500 ccm.

Die Analyse ergab: 25 ccm Zu^+ -Lösung = 0,1315 g Cu₂O
= 0,130 g Cu₂O
= 0,0525 g Zu^+ .

Das Organ enthielt: = 6,30 % Zucker
oder 5,840 % Glykogen.

B. (Stab 6.) 100 ccm Organlösung auf KOH 3 % gebracht + 10 g JK + 50 ccm Alkohol 96 %. Fällung viel geringer als bei A₁ (Eiweissfällung), setzt sich ab, wird abfiltriert, gewaschen, gelöst und invertiert in 500 ccm.

Die Analyse ergab: 25 ccm Zu^+ -Lösung = 0,3670 g Cu₂O
= 0,160 g Zu^+ .

Das Organ enthielt: = 9,60 % Zucker
oder 8,900 % Glykogen.

Der Verlust beträgt bei Vergleich von:

I	mit	II _{A₁}	1,7 %,
I	"	II _{A₂}	37,3 %,
II _{A₁}	"	II _{A₂}	36,2 %,
II _{A₁}	"	II _B	2,7 %.

Versuch III.

Ein Hund von 5 kg wird fünf Tage mit Fleisch und Reis gemästet. Er wird während der Verdauung getötet.

Hund ohne Blut und Leber	4880 g
Leber	314 g
Mageninhalt. .	321 g
Muskulatur . .	2000 g

I. (Stab 3.) 100 g Leberbrei + 100 ccm KOH 60% 2 Stunden im siedenden Wasserbad gekocht, dann durch Glaswolle filtriert, auf 400 ccm aufgefüllt.

2 × 100 ccm Organlösung + 100 ccm Alkohol 96%. Sehr starke Fällung setzt sich rasch ab, wird filtriert, gewaschen, gelöst, invertiert in 500 ccm.

$$\begin{aligned}
 \text{Die Analyse ergab: 25 ccm Zuckerlösung} &= 0,3705 \text{ g Cu}_2\text{O} \\
 &= 0,3670 \text{ g Cu}_2\text{O} \\
 &= 0,1605 \text{ g Zu}^+
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{Das Organ enthielt:} &= 12,84 \% \text{ Zucker} \\
 &\text{oder} = 11,90 \% \text{ Glykogen.}
 \end{aligned}$$

II₁. 200 g Leberbrei in 400 ccm KOH 2% siedend eingetragen, sechs Stunden gekocht; da noch keine Lösung eingetreten, Zusatz von 100 ccm KOH 2%. In acht Stunden Lösung. Es wird auf 800 ccm aufgefüllt und durch Papier 200 ccm abfiltriert. 100 ccm davon werden auf KOH 3% gebracht, mit 10 g JK versetzt und durch 50 ccm Alkohol 96% gefällt. Die Fällung setzt sich rasch ab, wird filtriert, gewaschen mit Alkohol 66% und 96%, gelöst und invertiert in 500 ccm.

$$\begin{aligned}
 \text{Die Analyse ergab: 25 ccm Zuckerlösung} &= 0,3205 \text{ g Cu}_2\text{O} \\
 &= 0,137 \text{ g Zu}^+.
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{Das Organ enthielt:} &= 10,96 \% \text{ Zucker} \\
 &\text{oder} = 10,16 \% \text{ Glykogen.}
 \end{aligned}$$

Der Verlust gegen I beträgt 14,6%. Aus dem Filtrat liess sich wie schon mitgeteilt, durch dreistündiges Kochen mit KOH 15% und Ausfällen mit 1 Vol. Alkohol 96% noch 0,14% Zucker — auf das Organ bezogen — gewinnen.

II₂. 100 ccm Organlösung werden 120 Stunden gekocht, auf 100 ccm aufgefüllt, auf KOH 3% gebracht, mit 10 g JK versetzt und mit 50 ccm Alkohol 96% ausgefällt. Die Fällung setzt sich ab,

wird filtriert, gewaschen mit Alkohol 66% und 96%, gelöst und invertiert in 500 ccm.

Die Analyse ergab: 25 ccm Zuckerlösung = 0,312 g Cu_2O
 = 0,133 g Zu.^+

Das Organ enthielt: = 10,64% Zucker
 oder = 9,86% Glykogen.

Der Verlust gegen I beträgt 17,1%
 " " " II_1 " 2,92%.

Versuch IV.

Ein Hund von 63½ kg wurde mit Fleisch und Reis gemästet und durch einen Schuss ins Gehirn getötet. Die Leber wog 1512 g.

I. (Stab 3.) $2 \times (100 \text{ g Leberbrei} + 100 \text{ ccm KOH } 60\%)$ drei Stunden bis zur Lösung gekocht, dann auf 400 ccm aufgefüllt und durch Glaswolle filtriert. Je 100 ccm Organlösung + 100 ccm Alkohol 96%. Die Fällung wird abfiltriert, gewaschen, gelöst, invertiert in 1000 ccm.

50 ccm Zuckerlösung = 0,1755 g Cu_2O
 = 0,1710 g Cu_2O
 Mittel = 0,17325 g
 = 0,071 g Zucker.

Die Analyse ergab: = 5,68% Zucker
 oder = 5,265% Glykogen.

II. $2 \times (100 \text{ g Leberbrei} + 200 \text{ ccm KOH } 2\%)$ 150 Stunden gekocht, auf 400 ccm aufgefüllt und durch Glaswolle filtriert. Je 100 ccm Organlösung + 20 ccm KOH 60% + 120 ccm Alkohol 96%. Die Fällung wird abfiltriert, gewaschen, gelöst, invertiert in 1000 ccm.

50 ccm Zuckerlösung = 0,1375 g Cu_2O
 = 0,1365 g Cu_2O
 = 0,1315 g Cu_2O
 = 0,1310 g Cu_2O
 Mittel = 0,13425 g
 = 0,054 g Zucker.

Die Analyse ergab: = 4,32% Zucker
 oder = 4,005% Glykogen.

Der Verlust beträgt 23,9%.

Versuch V.

Ein Hund von 12 kg wird 16 Tage mit Fleisch und Reis gemästet, dann durch Stich ins Rückenmark getötet. Gewicht der Leber 320 g. 80 g der Leber wurden mit siedendem Alkohol und Äther ausgezogen, dann getrocknet. Trockengewicht 22 g.

I. 10 g trocken + 30 ccm H_2O + 40 ccm KOH 60 % zwei Stunden gekocht bis zur Lösung, durch Glaswolle filtriert, auf 200 ccm aufgefüllt. 100 ccm Organlösung + 100 ccm Alkohol 96 %. Starke Fällung setzt sich ab, wird abfiltriert, gewaschen, gelöst, invertiert in 500 ccm.

Die Analyse ergab: 50 ccm = 0,3600 g Cu_2O

= 0,156 $Zu.$ ⁺

Das Organ enthielt: 8,581 % Zucker

= 7,955 % Glykogen.

II. 10 g trocken + 30 ccm H_2O + 80 ccm KOH 2 % bis zur vollständigen Lösung 2 1/2 Stunde gekocht, durch Glaswolle filtriert, auf 200 ccm aufgefüllt. 100 ccm Organlösung + 25 ccm KOH 60 % + 125 ccm Alkohol 96 %. Starke Fällung setzt sich ab, wird abfiltriert, gewaschen, gelöst, invertiert in 500 ccm.

Die Analyse ergab: 50 ccm = 0,3570 g Cu_2O

= 0,1547 g $Zu.$ ⁺

Das Organ enthielt: 8,509 % Zucker

oder = 7,888 % Glykogen.

Der Verlust beträgt 0,84 %, die beobachtete Differenz in Cu_2O = 3 mg.

Versuch VI.

Ein Hund von 5870 g wurde nach B. Schöndorff's¹⁾ Vorschriften zehn Tage gemästet. Er nahm in dieser Zeit 930 g zu und wurde dann durch Stich ins Rückenmark getötet.

Gewicht des Hundes 6800 g

Gewicht der Leber 485 g.

I. 100 g Leberbrei werden in 100 ccm KOH 60 % siedend eingetragen. Nach zwei Stunden Lösung. Auf 400 ccm aufgefüllt und durch Glaswolle filtriert.

1. 50 ccm Organlösung + 50 ccm Alkohol 96 %. Fällung wird abfiltriert, gewaschen, gelöst, invertiert in 500 ccm.

1) Pflüger's Arch. Bd. 99 S. 213.

Die Analyse ergab: 50 ccm = 0,477 g Cu_2O
 = 0,478 g Cu_2O

0,478 g Cu_2O = 0,219 g Zu.^+

Das Organ enthielt: 17,48 % Zucker
 oder 16,204 % Glykogen.

2. 50 ccm Organlösung + 5 g JK + 25 ccm Alkohol 96 %. Die Fällung setzt sich ab, wird abfiltriert, gewaschen, gelöst, invertiert in 500 ccm.

Die Analyse ergab: 50 ccm = 0,471 g Cu_2O
 = 0,471 g Cu_2O
 = 0,215 g Zu.^+

Das Organ enthielt: 17,20 % Zucker
 oder 15,944 % Glykogen.

Der Verlust beträgt 1,37 %.

II. 100 g Organ + 200 ccm KOH 2 % + 500 ccm H_2O = 800 ccm KOH 0,5 %. 24 Stunden gekocht bis zur Lösung, auf 800 ccm aufgefüllt, durch Glaswolle filtriert.

1. 100 ccm Organlösung + 25 ccm KOH 60 % + 125 ccm Alkohol 96 %. Die starke Fällung setzt sich ab, wird filtriert, gewaschen, gelöst, invertiert in 500 ccm.

Die Analyse ergab: 50 ccm = 0,4485 g Cu_2O
 = 0,4455 g Cu_2O
 = 0,2015 g Zu.^+

Das Organ enthielt: 16,12 % Zucker
 oder 14,94 % Glykogen.

2. 100 ccm Organlösung + 10 g JK + 5 ccm KOH 60 % + 55 ccm Alkohol 96 %. Die starke Fällung setzt sich ab, wird abfiltriert, gewaschen, gelöst, invertiert in 500 ccm.

Die Analyse ergab: 50 ccm = 0,4355 g Cu_2O
 = 0,1953 g Zucker.

Das Organ enthielt: 15,624 % Zucker
 oder 14,483 % Glykogen.

3. 500 ccm Organlösung werden 120 Stunden weitergekocht, auf 500 ccm aufgefüllt und durch Glaswolle filtriert.

a) 100 ccm Organlösung + 25 ccm KOH 60 % + 125 ccm Alkohol 96 %. Die starke Fällung setzt sich ab, wird abfiltriert, gewaschen, gelöst, invertiert in 500 ccm.

Die Analyse ergab: 50 ccm = 0,452 g Cu_2O
 = 0,450 g Cu_2O
 = 0,204 g Zu.^+

Das Organ enthielt: 16,32 % Zucker
 oder 15,129 % Glykogen.

Der diesmal bei 120stündigem Kochen erhaltene Wert ist etwas höher als der bei 24stündigem Kochen erzielte, doch beträgt die absolute Differenz in Cu_2O nur 3,5 mg, und diese Steigerung kann nur als Versuchsfehler gedeutet werden. Es zeigt sich hier ebenso wie in Versuch 3 bei längerem Kochen mit verdünnter KOH keine Abnahme, sondern ein Gleichbleiben der Werte.

b) 100 ccm Organlösung + 5 ccm KOH 60 % + 10 g JK + 55 ccm Alkohol 96 %. Die Fällung setzt sich ab, wird filtriert, gewaschen, gelöst, invertiert in 500 ccm.

Die Analyse ergab: 50 ccm = 0,429 g Cu_2O
 = 0,432 g Cu_2O
 = 0,193 g Zu.^+

Das Organ enthielt: 15,44 % Zucker
 oder 14,313 % Glykogen.

III. 100 g Organbrei + 200 ccm KOH 2 % + 500 ccm H_2O . 130 Stunden gekocht, auf 800 ccm aufgefüllt, durch Glaswolle filtriert. Weiter behandelt wie IIa und b.

a) Fällung aus KOH 15 % mit 1 Vol. Alkohol 96 % invertiert in 500 ccm.

50 ccm = 0,4390 g Cu_2O
 = 0,4375 g Cu_2O
 = 0,197 g Zu.^+

Die Analyse ergab also: 15,76 % Zucker
 oder 14,61 % Glykogen.

b) Fällung aus KOH 3 % mit 10 % JK und $\frac{1}{2}$ Vol. Alkohol 96 % invertiert in 500 ccm.

50 ccm = 0,4160 g Cu_2O
 = 0,185 g Zucker.

Die Analyse ergab also: 14,80 % Zucker
 oder 13,72 % Glykogen.

Es ist also in den zehn Stunden, die diese Lösung länger kochte, wieder ein Teil des Glykogens verloren gegangen, und die Alkohollöslichkeit hat wieder etwas zugenommen.

Die mitgeteilten Untersuchungen haben für die Annahme gebundenen Glykogens keine Stütze geliefert. Es ist aber ebenso wenig gelungen, Nerking's Ergebnisse aufzuklären, welche so entschieden für die Annahme gebundenen Glykogens sprechen. Es kann nicht genügen, mit M. Cremer und E. Salkowski die Resultate Nerking's auf Beobachtungsfehler zurückzuführen, ohne dass die Art dieser Fehler nachgewiesen wird. Da Nerking seine Ergebnisse durch zahlreiche Kontrollanalysen, welche vorzüglich stimmen, gesichert hat, und da die gewissenhafte und zuverlässige Art seiner im hiesigen Laboratorium ausgeführten Untersuchungen bekannt ist, kann es als sicher gelten, dass alle analytischen Zahlen Nerking's richtig sind. Nur unter dieser Voraussetzung wollen wir nunmehr suchen, wo der Fehler bei Nerking liegen kann. Nerking verfolgte zum Nachweis des gebundenen Glykogens drei verschiedene Wege (A, B, C), welche nacheinander von uns geprüft werden sollen.

A. Nerking kochte (Pflüger's Arch. Bd. 81 S. 30 Reihe XIV) den Brei der frischen Kalbsleber in sehr verdünnter Kalilauge und fand, dass bei kurzer Kochdauer als Glykogenegehalt der

Leber gefunden wurde . . .	0,5543 %,
bei langer Kochdauer . . .	1,3869 %.

Bei längerem Kochen erhöhte sich also die Ausbeute an Glykogen um 150 %.

Betrachten wir diesen Versuch genauer, so ergibt sich, dass Nerking 400 g Leberbrei in 1600 ccm KOH 1 % acht Stunden bis zur Lösung im Wasserbad gekocht hat. Nach dem Erkalten wurde auf 2500 ccm aufgefüllt. Nachdem Nerking die Hälfte der Flüssigkeit = 1250 ccm durch ein einfaches oder auch doppeltes Schnellfilter abfiltriert hatte, kochte er diese weiter 120 Stunden und benutzte die „restierenden“ 1250 ccm, die also nur acht Stunden gekocht worden waren, zur sofortigen Analyse. Auf diesen Punkt machte mich Herr Professor Pflüger aufmerksam und entwickelte dabei die im folgenden wiedergegebene Theorie: Wenn man das Filtrat einer nach Nerking gewonnenen Leberlösung betrachtet, bemerkt man, dass die zuerst sehr schnell durchs Filter gehende Flüssigkeit stark getrübt ist. Mit der Zeit verlangsamt sich die Filtration, und gleichzeitig wird das Filtrat weniger trüb; ja, zuletzt erscheint dasselbe ganz klar. Die ersten von Nerking abfiltrierten 1250 ccm bildeten also ein stark getrübtetes Filtrat; die später ab-

filtrierten waren weniger getrübt oder ganz klar. Beide sollten miteinander verglichen werden, wobei Nerking als selbstverständlich voraussetzte, dass der Glykogengehalt in beiden Fraktionen derselbe sein müsse, weil sie Filtrate derselben Leberlösung waren. Der Augenschein zeigt aber, dass diese verschiedenen Fraktionen des Filtrats sich wesentlich durch Trübung und Klarheit unterscheiden. Die Trübung ist durch winzige ungelöste Teilchen bedingt, welche beim Beginn der Filtration sogar sehr gutes Filtrierpapier durchsetzen, dann aber allmählich mehr und mehr verstopfen. Nerking benutzte Schnellfilter.

Die nie fehlende Trübung der sogenannten Leberlösung beweist, dass nicht alle Teile des Organs in Lösung gebracht wurden. Da beim Kochen der Organe mit verdünnter Kalilauge meist sehr viele Stunden verstreichen bis zur vollständigen Lösung, so ist natürlich gewöhnlich die Trübung des Filtrats wenigstens teilweise durch noch ungelöste Teilchen des Organes bedingt. Ein durch wiederholte Filtration der trüben Organlösung erhaltenes klares Filtrat setzt aber bei weiterem Kochen, selbst ohne Änderung der Konzentration aufs neue Flocken ab. Deshalb kann man niemals bei noch so lang fortgesetztem Kochen von Leberbrei mit verdünnter Kalilauge eine vollkommene wirkliche Lösung erhalten. Es hängt nun von der Natur des Filters ab, ob und wieviel sie von den ungelösten Teilchen durchlässt. Dass die ungelöst gebliebenen Teilchen noch Glykogen einschliessen, ist kaum zu bezweifeln. Dass die durch das Kochen nachträglich entstandenen Flocken bereits gelöstes Glykogen in sich aufsammeln, ist auch kaum zu bezweifeln. Denn wenn man eine Glykogenlösung, die ein wenig Kalialbuminat enthält, neutralisiert, so scheiden sich Eiweissflockchen aus. Setzt man eine Jodlösung hinzu, so färben sich die Flöckchen stark rot, die Flüssigkeit aber nur schwach, weil eben die Gerinsel das vorhandene gelöste Glykogen eingeschlossen haben.

Da also in den ungelöst gebliebenen Teilchen der Abkochung noch Glykogen eingeschlossen ist, so liegt die Möglichkeit vor, dass das Glykogen in der Flüssigkeit und den ungelösten Teilchen nicht gleichmässig verbreitet ist. Bedenkt man die ungeheure Verdünnung der Leberlösung in Nerking's Versuch: 400 g Leber auf 2500 ccm, so ist notwendig dann der Glykogengehalt zweier ungleich getrühten Fraktionen des Filtrates derselben Leberlösung verschieden.

Es wird also jetzt unsere Aufgabe sein, den Einfluss dieser un-

gelösten Teilchen auf den Glykogengehalt der Filtrate festzustellen. Wir werden demgemäss verschiedene Fraktionen der zu vergleichenden Filtrate auf hohen Kaliegehalt bringen, um durch das dann ausgeführte Kochen das gesamte vorhandene Glykogen, falls es gebunden war, aufzuschliessen, oder doch die noch nicht gelösten trübenden Organteilchen in Lösung überzuführen.

Es folgen die Versuche.

Versuch I.

Material: Kalbsleber (Kalb 18 Tage alt). 400 g Leberbrei wurden in 800 ccm siedender Kalilauge 2% eingetragen und mit 800 ccm heissen Wassers nachgespült. Nacht achtstündigem Kochen war Lösung eingetreten. Die Lösung wurde abgekühlt, auf 2500 ccm aufgefüllt und durch Glaswolle gegossen. Die trübe Lösung wurde dann auf zwei Faltenfilter gebracht.

Die ersten 300 ccm = 43 g Leber wurden gesondert aufgefangen; sie waren stark getrübt. Sie blieben einstweilen stehen. Nach circa 20 Stunden waren im ganzen 1250 ccm durchfiltriert. Die nun folgenden 300 ccm (1250—1550) wurden wieder gesondert aufgefangen. Sie waren fast klar.

Die beiden so erhaltenen verschiedenen Filtrate (1—300), (1250 bis 1550) wurden gleichzeitig in Arbeit genommen. Beide wurden mit je 71 g des festen Merck'schen KOH, das gemäss einer Bestimmung einen Gehalt von 85% KOH hat, versetzt und gleichzeitig in dasselbe siedende Wasserbad versenkt. Nach zweistündigem Kochen wurden beide Lösungen abgekühlt, durch dichte Glaswolle filtriert, da sich wieder gröbere Flocken ausgeschieden hatten, und auf 400 ccm aufgefüllt.

Beide Lösungen wurden dann mit 1 Vol. Alkohol 96% versetzt. Die geringe Fällung setzte sich nur langsam ab, wurde abfiltriert, gewaschen, gelöst, invertiert im 300 ccm-Kolben.

Die Analyse ergab für das trübe Filtrat I (1—300):

$$\begin{aligned} 81 \text{ ccm} &= 0,1480 \text{ g Cu}_2\text{O} \\ &= 0,1450 \text{ g Cu}_2\text{O} \\ \hline \text{Mittel} &= 0,1465 \text{ g Cu}_2\text{O} \\ &= 0,0595 \text{ g Zucker} \end{aligned}$$

einen Gehalt von 0,458% ⁺Zu.

Die Analyse für das klare Filtrat II (1250—1550):

$$\begin{aligned} 81 \text{ ccm} &= 0,1055 \text{ g Cu}_2\text{O} \\ &= 0,1020 \text{ g Cu}_2\text{O} \\ \text{Mittel} &= 0,1037 \text{ g Cu}_2\text{O} \\ &= 0,0408 \text{ g Zucker} \end{aligned}$$

einen Gehalt von 0,315 %. Also, wenn man wie Nerking rechnet, eine Zunahme von 45,4 %.

Versuch II.

Material: Kalbsleber. 400 g Leberbrei wurden in 800 ccm siedender KOH 2% eingetragen und mit 800 ccm heissen Wassers nachgespült, auf offener Flamme zehn Minuten, dann im Wasserbad acht Stunden erhitzt. Da noch nicht vollständige Lösung eingetreten war, wurden die ungelösten Organreste auf Glaswolle abfiltriert, mit 100 ccm KOH 1% fein zerrieben, der Organlösung wieder zugesetzt und noch zwei Stunden bis zur Lösung weitergekocht. Die erhaltene Organlösung wurde auf 2500 aufgefüllt, erst durch dichte Glaswolle gegossen, dann auf drei Faltenfilter verteilt.

Es wurde gesondert aufgefangen:

1. Filtrat I 1—300,
2. Filtrat II 300—1000 (davon 300 verarbeitet),
3. Filtrat III 1250—1550,
4. Filtrat IV 1700—2000.

Gleichzeitig in Arbeit genommen wurde Filtrat I und III einerseits und Filtrat II und IV andererseits. Je 300 ccm dieser Filtrate wurden mit 71 g des festen Merck'schen KOH von 85 % versetzt und zwei Stunden gekocht, durch Glaswolle filtriert, auf 400 ccm aufgefüllt, wobei gleichzeitig das Filter ausgewaschen wurde, und mit 400 ccm Alkohol 96 % versetzt. Die Fällungen von III und IV waren sichtlich geringer als bei I und II; sie wurden abfiltriert, gewaschen, gelöst, I und II in je 500 ccm, III und IV in 300 ccm invertiert. Die Zuckerbestimmung fand wie bei allen Versuchen mittels der Pflüger'schen Kupferoxydulmethode statt.

Es ergaben sich folgende Werte:

$$\begin{aligned} \text{Filtrat I } 0,623 \% \text{ Zucker } 81 \text{ ccm Zuckerlösung} &= 0,1220 \text{ g Cu}_2\text{O} \\ &= 0,1200 \text{ g Cu}_2\text{O} \\ &= 0,0484 \text{ g Zucker} \\ \text{Filtrat II } 0,515 \% \text{ Zucker } 81 \text{ ccm Zuckerlösung} &= 0,1020 \text{ g Cu}_2\text{O} \\ &= 0,040 \text{ g Zucker} \end{aligned}$$

Filtrat III	0,272 % Zucker	81 ccm Zuckerlösung	= 0,0910 g Cu ₂ O
			= 0,0910 g Cu ₂ O
			= 0,0352 g Zucker
Filtrat IV	0,166 % Zucker	81 ccm Zuckerlösung	= 0,0590 g Cu ₂ O
			= 0,0215 g Zucker

In diesem Falle hätte man also bei einer Versuchsanordnung, wie Nerking sie verwendete, bei Vergleich von Filtrat I und III eine Zunahme von 129 %, bei Vergleich von I und IV sogar eine Zunahme von 275 % bezw. einen Verlust von 73 % zu verzeichnen gehabt.

Es war von Interesse, zu fragen, ob das Glykogen auch auf dem Filter zurückgehalten wird, obwohl es bereits zum Teil aus den noch ungelösten Gewebsteilchen in die Lösung übergegangen ist. Es wurden deshalb 100 g der in Versuch II verarbeiteten Leber in 1000 ccm siedenden Wassers eingetragen. Nach 24 Stunden wurde der wässrige Auszug durch Glaswolle abfiltriert; der Leberückstand wurde fein zerrieben, dann wieder mit 100 ccm Wasser versetzt und weitere 24 Stunden gekocht, wie das erste Mal abfiltriert, zerrieben und zum drittenmal 48 Stunden im siedenden Wasserbad gekocht. Die so erhaltenen drei wässrigen Auszüge werden auf ein kleines Volum eingeeengt, mit dem Brücke'schen Reagens das Eiweiss ausgefällt, abfiltriert und der Niederschlag ausgewaschen. Die so erhaltene Flüssigkeit betrug 1360 ccm. Davon wurden 500 ccm = 36,8 g Leber mit 1000 ccm Alkohol 96 % versetzt. Das Glykogen setzte sich über Nacht ab, wurde abfiltriert, gewaschen, gelöst, invertiert in 300 ccm.

81 ccm	= 0,0860 g Cu ₂ O
	= 0,0855 g Cu ₂ O
Mittel	= 0,0857 g Cu ₂ O = 0,033 g Zucker
300 ccm Zuckerlösung	= 0,1222 g Zucker
	= 0,332 % Zucker.

Dieser Wert ist bedeutend höher als die in Versuch II Fraktion 3 und 4 gefundenen. Man muss also entweder annehmen, dass durch Heisswasserextraktion doch ein Teil des chemisch gebundenen Glykogenes abgespalten wird, oder aber, dass durch irgendwelche bei der Filtration wirkende Bedingungen auch freies Glykogen zurückgehalten werden kann. Wie schon in der Einleitung bemerkt wurde, soll ersteres nicht entschieden

werden; dagegen müssen die bei der Filtration nach Nerking hergestellter Leberlösungen herrschenden Bedingungen noch näher untersucht werden, vor allem, da die beobachteten Glykogenverluste von 31 % und 73 % das Mass dessen, was durch Annahme noch nicht gelöster glykogenhaltiger Organteilchen erklärt werden kann, weit übersteigen, denn wir müssten ja sonst annehmen, dass sich in dem einen Falle wenigstens 30 %, in dem anderen gar wenigstens 73 % der zur Analyse verwendeten Organmenge noch in ungelöstem Zustande befunden hätten. Die Höhe dieser Zahlen beweist, dass es noch eine andere Erklärung für die bei der Filtration eintretenden Glykogenverluste giebt.

Es bleiben drei Möglichkeiten für die Art, in der das Glykogen beim Filtrieren der Organlösungen zurückgehalten werden konnte. Wir haben schon besprochen, dass ein Teil des Glykogenes in den noch ungelösten Leberteilchen enthalten sei und dann mit diesen auf dem Filter zurückbliebe; die zweite Möglichkeit wäre, dass das gelöste Glykogen durch sekundär sich bildende Koagula umschlossen und festgehalten würde. Auch diese Möglichkeit wurde schon besprochen. Drittens käme eine Verstopfung des Filters in Betracht.

Eine auffallende Beobachtung habe ich mit Filtration einer Glykogenlösung gemacht, die nur sehr geringe Mengen Eiweiss enthielt. Nachdem die Glykogenlösung mit wenig fein zerteilter Kohle versetzt war, goss ich sie auf ein schwedisches Filter. Die ersten 50 ccm wurden (A) gesondert aufgefangen; sie liefen in etwa $\frac{1}{2}$ Minute durchs Filter. Dagegen brauchte Fraktion 1250—1300 über vier Stunden.

Es war also eine sehr bedeutende Verstopfung des Filters eingetreten. Die beiden Filtrate 1—50 und 1250—1300 wurden invertiert und nach Pflüger's Kupferoxydulmethode analysiert. Die beiden Analysen stimmten aufs Milligramm genau überein.

Die betreffende Glykogenlösung wurde aus Glykogen hergestellt, das von Mad. Gatin im hiesigen Laboratorium nach der Pflüger - Nerking'schen Jodkalimethode aus einer Hundeleber gewonnen und mehrfach mit Tierkohle gereinigt worden war. Für die freundliche Überlassung des Präparats bin ich Mad. Gatin zu Dank verpflichtet.

Eiweissreaktionen: Biuretprobe — negativ. Xanthoproteinprobe äusserst schwach. Heller'sche Probe negativ.

Vor der Filtration wurde die Lösung nicht quantitativ bestimmt.
Je 50 ccm Glykogenlösung wurden invertiert in 200 ccm.

81 ccm ergaben A. 0,448 g Cu_2O ,

B. 0,448 g Cu_2O ,

0,4479 g Cu_2O = 0,202 g Zucker.

In 81 ccm Zuckerlösung 0,202 g Zucker.

Also 0,99752 % Zucker,

= 0,9247 % Glykogen.

Der Versuch wurde nur einmal gemacht.

Es kommen also auch bei kolloidalen Lösungen Verhältnisse vor, welche gleiche Strömungsgeschwindigkeit des Lösungsmittels und der gelösten Substanz bewirken, was durch die Wasseranziehung der mit einer absorbierten Schicht überzogenen Porenwände bedingt sein kann. In diesem Falle handelt es sich um eine ganz ungeheure Verlangsamung der Filtration, also auch um eine ausserordentliche Verminderung der Strömungsgeschwindigkeit des Wassers, so dass das langsam diffundierende Glykogenmolekül damit Schritt halten konnte. Verallgemeinerung ist nicht zulässig.

In diesem Falle war also die Verstopfung des Filters allein nicht ausreichend, um eine Konzentrationsänderung der filtrierenden Glykogenlösung zu bewirken. Ganz andere Resultate ergaben sich, als Verhältnisse hergestellt wurden, wie sie bei Nerking's Versuchen herrschten, d. h. als die ungelösten Bestandteile einer Nerking'schen Leberlösung verwendet wurden, um die Filter zu verstopfen. Infolge ihrer ausserordentlichen Kleinheit dringen diese Partikelchen tief in die Poren des Filters ein und gehen sogar in den ersten Fraktionen noch zum grössten Teil durchs Filter. Allmählich legen sie sich dann in den Maschen des Filters im Laufe der Filtration so vollständig fest, dass es wie die Membran eines Dialysators wirken kann; da aber Glykogen nur in äusserst geringem Masse diffundiert, so vermögen auch die Teilchen der Glykogenlösung diese Membran bei der Filtration nur in sehr geringer Zahl zu durchsetzen.

Aus der trüben, auf dem Filter stehenden Organlösung senken sich allmählich ungelöste Teilchen, und ausserdem bleiben von der filtrierenden Flüssigkeit immer ungelöste Teilchen auf dem Papier zurück.

Da also die Eiweisschicht mit der Dauer der Filtration immer dicker und dichter wird, so wird sich auch der Glykogengehalt der

durchgehenden Lösungen in entsprechendem Masse vermindern. Schliesslich bleibt der grösste Teil des Glykogens auf dem Filter zurück.

Schon 1893 hat J. Weidenbaum¹⁾ im hiesigen Institut ähnliche Verhältnisse beobachtet. Er findet bei der kritischen Nachprüfung der Fränkel'schen Methode der Glykogengewinnung mit Trichloressigsäure, dass bei Filtration eiweisshaltiger Glykogenlösungen „je nach der Natur des Filters verschiedene Mengen Glykogen verloren gehen, die von dem die Poren des Filters verstopfenden Eiweiss zurückgehalten werden“.

Es war wünschenswert, noch durch strengere Versuche den Beweis zu erbringen, dass der Glykogenverlust beim Filtrieren sicher auch das bereits freie gelöste Glykogen betrifft. Darauf basieren die folgenden Versuche, in denen zu den nach Nerking hergestellten Leberlösungen Glykogenlösungen, also sicher freies Glykogen künstlich zugesetzt wurden. Die so vorbereiteten Lösungen wurden filtriert und durch die Analyse verschiedener Fraktionen nachgewiesen, dass auch ein Teil des zugesetzten, also sicher freien Glykogenes bei der Filtration verschwindet. Gleichzeitig wurden immer Kontrollanalysen gemacht, in denen der Glykogenegehalt und Glykogenverlust der ursprünglichen, noch nicht mit Glykogen versetzten Lösungen bestimmt wurde. Zum Belege dienen die folgenden Versuche:

Versuch I.

Material: Kalbsleber. 400 g Leberbrei + 800 ccm KOH 2 % + 800 ccm H₂O zehn Stunden im siedenden Wasserbad gekocht, durch dichte Glaswolle von ein paar ungelösten Klumpen abfiltriert und auf 2000 ccm aufgefüllt.

A. 1000 ccm werden mit 200 ccm Glykogenlösung gut gemischt und auf zwei Faltenfilter verteilt.

1. Erstes Filtrat 1—100 (stark getrübt) + 25 ccm KOH 60 %, zwei Stunden im Wasserbad gekocht; gefällt durch 125 ccm Alkohol 96 % abfiltriert, gewaschen, gelöst, invertiert in 200 ccm.

$$\begin{aligned} 81 \text{ ccm} &= 0,3735 \text{ g Cu}_2\text{O} \\ &= 0,163 \text{ g Zucker.} \end{aligned}$$

1) J. Weidenbaum, Pflüger's Arch. Bd. 54 S. 324.

2. Fraktion 480—580 ccm von beiden Filtern (ganz klar). 100 ccm + 25 ccm KOH 60 % zwei Stunden im Wasserbad gekocht, gefällt durch 125 ccm Alkohol 96 %, abfiltriert, gewaschen, gelöst, invertiert in 200 ccm.

$$\begin{aligned} 81 \text{ ccm} &= 0,212 \text{ g Cu}_2\text{O} \\ &= 0,088 \text{ g Zucker.} \end{aligned}$$

Der Verlust beträgt 75 mg Zucker.

B. Die anderen 1000 ccm der ursprünglichen Leberlösung werden mit 200 ccm H₂O versetzt und auf zwei Faltenfilter verteilt.

1. Erstes Filtrat 1—100 (stark getrübt). 100 ccm + 25 ccm KOH 60 %, zwei Stunden im Wasserbad gekocht, gefällt durch 125 ccm Alkohol 96 %, abfiltriert, gewaschen, gelöst, invertiert in 200 ccm.

$$\begin{aligned} 81 \text{ ccm} &= 0,0420 \text{ g Cu}_2\text{O} \\ &= 0,014 \text{ g Zucker.} \end{aligned}$$

2. Fraktion 480—570 (ganz klar). 90 ccm + 10 ccm H₂O + 25 ccm KOH 60 %, zwei Stunden im Wasserbad gekocht, ausgefällt durch 125 ccm Alkohol 96 % abfiltriert, gewaschen, gelöst, invertiert in 150 ccm.

$$\begin{aligned} 81 \text{ ccm} &= 0,0120 \text{ g Cu}_2\text{O} \\ &= 0,006 \text{ g Zucker.} \end{aligned}$$

Den übrigen Werten entsprechend umgerechnet: 4,5 mg Zucker.

Es ist also fünfmal mehr Glykogen verloren gegangen, als ursprünglich in der Organlösung vorhanden war. Es ist also ein grosser Teil des zugesetzten, sicher nicht gebundenen Glykogens mit auf dem Filter zurückgehalten worden.

Versuch II.

Material: Kalbsleber. 400 g Leberbrei + 800 ccm KOH 2 % + 800 ccm H₂O, 18 Stunden bis zur Lösung gekocht, aufgefüllt auf 2000 ccm.

A. 900 ccm der Lösung + 100 ccm Glykogenlösung auf zwei Faltenfilter verteilt:

1. Fraktion 1 von einem Filter 1—100 stehen lassen, bis auch Filtrat 2 durchfiltriert war, dann: 100 ccm + 25 ccm KOH 60 %; drei Stunden im siedenden Wasserbad gekocht, mit 125 ccm Alkohol 96 % ausgefällt, filtriert, gewaschen, gelöst, invertiert in 200 ccm

$$\begin{aligned} 81 \text{ ccm} &= 0,2735 \text{ g Cu}_2\text{O} \\ &= 0,1155 \text{ g Zucker.} \end{aligned}$$

2. Filtrat 2. Fraktion 600—700 nach 18 Stunden klar durchfiltriert. 100 ccm + 25 ccm KOH 60 % im Wasserbad drei Stunden gekocht, mit 125 ccm Alkohol 96 % ausgefällt, abfiltriert, gewaschen, gelöst, invertiert in 200 ccm.

$$\begin{aligned} 81 \text{ ccm} &= 0,1235 \text{ Cu}_2\text{O} \\ &= 0,0495 \text{ g Zucker.} \end{aligned}$$

Es ist ein Verlust von 66 mg Zucker eingetreten.

B. 900 ccm derselben Lösung + 100 ccm Wasser auf zwei Filter verteilt.

1. Filtrat 1. Fraktion 1—100 von einem Filter aufgefangen, gleichzeitig verarbeitet mit Filtrat 2. 100 ccm + 25 ccm KOH 60 % im Wasserbad drei Stunden gekocht, durch 125 ccm Alkohol 96 % ausgefällt, abfiltriert, gewaschen, gelöst, invertiert in 200 ccm.

$$\begin{aligned} 81 \text{ ccm} &= 0,1440 \text{ g Cu}_2\text{O} \\ &= 0,0585 \text{ g Zucker.} \end{aligned}$$

2. Filtrat 2. Fraktion 600—700. 100 ccm + 25 ccm KOH 60 % im siedenden Wasserbad drei Stunden gekocht, durch 125 ccm Alkohol 96 % ausgefällt, abfiltriert, gewaschen, gelöst, invertiert in 200 ccm.

$$\begin{aligned} 81 \text{ ccm} &= 0,0930 \text{ g Cu}_2\text{O} \\ &= 0,036 \text{ g Zucker.} \end{aligned}$$

Auch hier ist der bei der Filtration eingetretene Verlust grösser als der ursprüngliche Glykogenegehalt überhaupt; es muss also auch hier notwendig ein Teil des zugesetzten freien Glykogens zurückgehalten worden sein.

Aus allen diesen Untersuchungen folgt also, dass der Glykogenverlust eine grössere Zahl von Ursachen hat, nämlich Einschluss in ungelöste Teilchen, Grad der Durchlässigkeit des Filters für diese ungelösten Teilchen, Einklemmung gelöster Glykogenteilchen in verengten Poren, die mit der Dauer der Filtration an Zahl zunehmen.

Weil diese Verhältnisse mit der Dauer des Kochens derselben Organlösung sich fortwährend ändern, ebenso mit der Dauer der Filtration, begreift man, dass je nach Umständen der Glykogenegehalt der verschiedenen Fraktionen des Filtrates sehr verschieden ausfallen kann.

Nerking nahm an, dass diese verschiedenen Fraktionen gleichen Glykogenegehalt haben müssten. Da derselbe also von vornherein verschieden war, hätte Nerking gar nicht nötig gehabt,

länger zu kochen, um grössere oder auch kleinere Glykogengehalte zu finden. Die Organlösungen, die er kurze oder lange Zeit kochen wollte, waren also schon vor dem Kochen verschieden im Glykogengehalte.

B.

Die zweite Methode, durch welche Nerking das gebundene Glykogen nachweisen wollte, bestand darin, dass er mehrere Portionen desselben Organbreis verschieden lange Zeit mit sehr verdünnter Kalilauge kochte und in dem Filtrat hiervon das Glykogen quantitativ bestimmte.

Wir wollen nun alle Versuche, welche nach der A-Methode Nerking's ausgeführt wurden, erklären.

Das sind die Versuche seiner Reihe XIV¹⁾. Beim Kochen von Leber mit verdünnter KOH-lauge bis zur Lösung werden 0,5543 % erhalten; nach längerem (bis 120 Stunden) Kochen steigt die Ausbeute auf 1,3869 % Glykogen, also auf mehr als das Doppelte.

Nerking benutzte zwei verschiedene Fraktionen des Filtrates derselben Leberlösung. Die erste Fraktion, welche also noch sehr trüb war, folglich viele glykogenhaltige Partikelchen enthielt und viel freies Glykogen, weil das Filter noch nicht stärker verstopft war, benutzte er zum längeren Kochen und erhielt relativ viel Glykogen.

Die zweite Fraktion ist natürlich weniger getrübt gewesen, eventuell ganz klar und war durch ein bereits stark verstopftes Filter gegangen. Folglich musste sie weniger Glykogen als die erste enthalten.

Dass Nerking beim Kochen mit stärkerer Kalilauge die grösseren Werte erhielt, ist auch selbstverständlich. Denn die starke Lauge verringert die Zahl der ungelösten Teilchen, und es wurde zur Analyse hier offenbar wieder die erste Fraktion des Filtrates benutzt.

Es ist von vornherein eigentlich selbstverständlich, dass bei längerem Kochen desselben Organbreis mit der sehr verdünnten Kalilauge die ungelösten Teilchen des Organes abschmelzen und kleiner werden. Da die Teilchen vielleicht zerfallen, lässt sich der Einfluss auf die Zahl derselben nicht angeben. Hinzu kommt, dass

1) Nerking, dieses Arch. Bd. 81 S. 30. 1900.

bei längerem Kochen neue Ausscheidungen sich bilden, die in Form von Flöckchen auftreten und sich allmählich vermehren.

Dass die Dauer des Kochens auf Zahl und Beschaffenheit der ungelösten Teilchen einen grossen Einfluss ausübt, also auch auf die Filtration, ist selbstverständlich. Letztere beeinflusst aber den Glykogenegehalt des Filtrates in eingreifender Weise. Ich habe mich durch besonderen Versuch überzeugt, dass, um 800 ccm Filtrat von der lange Zeit gekochten Leberlösung zu erhalten, neun Stunden verflossen, während für die gleiche, nur kurze Zeit gekochte Lösung 24 Stunden nötig waren, um das gleiche Quantum zu erhalten. Die entsprechenden Fraktionen der zu vergleichenden verschieden lange gekochten Lösungen finden also bei der Filtration ganz verschiedene Widerstände. Während das eine Filter schon fast vollständig durch Eiweisseinlagerungen verdichtet ist, findet vielleicht bei dem anderen der grösste Teil des Glykogenes noch zwischen den gröberen Eiweissablagerungen und durch noch relativ weite Poren seinen Weg. Wir haben schon bewiesen, dass bei verschiedenen Fraktionen derselben Leberlösung die Verluste mit zunehmender Verstopfung stetig wachsen.

Auch bei diesen Versuchen ist der Grad der Verstopfung das Massgebende. Da aber diese Verstopfung bei den kürzere Zeit gekochten Lösungen bedeutend schneller eintritt, so ist ein höherer Glykogenegehalt der Filtrate der längere Zeit gekochten Lösungen sehr begreiflich. Hinzu kommt folgendes: Nerking benutzte niemals das ganze Filtrat seiner Lösungen zur Analyse, sondern stets nur einen kleinen Teil. Das ganze Filtrat ist ja auch deshalb nicht zu verwenden, weil ein grosser Teil in dem Filter steckt, und weil mehrere Tage verfliessen würden, bis fast alle Flüssigkeit durchgegangen ist. Deshalb hat sicher Nerking gleich von Anfang an dieselbe Leberlösung durch mehrere Filter gegossen, so dass die verschiedene Porosität der Filter noch einen Einfluss auf die Menge des durchgehenden oder zurückgehaltenen Glykogens gewinnt. Da nun der Glykogenegehalt jeder Fraktion ein anderer ist, folgt mit Notwendigkeit daraus, dass konstante Resultate nicht erwartet werden dürfen. Das zeigt sich denn auch bei Nerking's Versuchen. Bald geht mit längerer Kochdauer Zunahme, bald Abnahme, bald unveränderter Bestand einher. Die grösste Zahl der in Bd. 81 enthaltenen Versuche gehört hierher. Das Wesentliche bei ihrer Er-

klärung liegt darin, dass das Filtrat des kürzere Zeit gekochten Leberbreis nicht deshalb arm an Glykogen erschien, weil es nicht langgenug erhitzt war, sondern weil infolge der grösseren Zahl verstopfender glykogenhaltiger Elemente ein grösserer Teil des Glykogens auf dem Filter zurückbleibt, und weil noch weniger freies gelöstes Glykogen vorhanden ist. Die erhaltenen glykogenarmen Filtrate hätten auch bei längerem Kochen mit Kali keine Zunahme an Glykogen mehr ergeben können.

Zur Erklärung der Versuche Nerking's braucht man also nicht mehr die Annahme gebundenen Glykogenes; sie erklären sich alle aus dem bisher Gefundenen auf folgende Weise:

Glykogenverluste bei längerem Kochen erklären sich durch die Wirkung der verdünnten Kalilauge, durch die das Glykogen in geringem Masse zersetzt wird. Meist werden die hierdurch bedingten, von Nerking beobachteten Verluste klein sein, da die bei der Filtration der kurze Zeit gekochten Lösungen beobachteten Verluste durchschnittlich viel grösser sein werden als die bei langem Kochen gefundenen, und da sich dadurch die beiden Werte einander wieder nähern werden; doch sind diese Verhältnisse auch wieder abhängig von der Wahl der Fraktionen¹⁾.

Wenn Nerking bei längerem Kochen Gleichbleiben oder Vermehrung des Glykogengehalts beobachtete, so war das nur ein scheinbarer Zuwachs, der dadurch vorgetäuscht wurde, dass bei den kurze Zeit gekochten Lösungen bei der Filtration bedeutende Verluste eintraten, die so gross waren, dass sie selbst die infolge langer Kaliwirkung eingetretenen thatsächlichen Glykogenverluste der lange gekochten Lösungen zu verdecken vermochten.

Nerking fand:

Reihe I. Ochsenfleisch. Zweifelhaftes Ergebnis.

Reihe II. Ochsenfleisch. Geringe Zunahme der Glykogenausbeute bei längerem Kochen.

Reihe III. Ochsenfleisch. Abnahme der Ausbeute bei längerem Kochen. Reihe III schon besprochen.

Reihe IV. Pferdefleisch. Geringe Zunahme.

1) Aus Verlusten bei der Filtration durch Papier erklärt sich auch bei den drei ersten meiner Versuche (S. 603) die relative Höhe der Verluste.

Reihe V. Kaninchenfleisch und Leber. A. Leber. Abnahme bei längerem Kochen. B. Muskeln. Zweifelhaft bei längerem Kochen.

Reihe VI. Ochsenfleisch. Bei längerem Kochen unverändert.

Reihe VII. Ochsenfleisch. A und B bei längerem Kochen geringe Vermehrung der Ausbeute.

Reihe VIII. Schon besprochen.

Reihe IX. Gleichbleiben bei 5- und 24stündigem Kochen.

Reihe X. Kalbsleber. Zunahme von 115 % Glykogen bei längerem Kochen.

Erklärung. Die kürzere Zeit gekochte Leberlösung enthielt mehr und feiner verteilte ungelöste Substanzteilchen als die länger gekochte. Die Folge davon war, dass sich das Filter viel rascher und viel vollständiger verstopfte als bei dem länger gekochten Vergleichsversuch. Dem höheren Grade der Verstopfung entsprechend blieb mehr Glykogen auf dem Filter zurück; das Filtrat wurde also entsprechend ärmer an Glykogen. Dieses glykogenärmere Filtrat der nur kurze Zeit gekochten Leberlösung hätte bei längerem Kochen auch nicht mehr Glykogen geliefert.

Reihe XI. Kalbsleber. Versuchsanordnung wie bei X. Ergebnis: Verlust von 12,3 % des Gesamtglykogens.

Reihe XII. Kalbfleisch. Geringe Vermehrung der Ausbeute bei Vergleichung der verschieden lange Zeit gekochten Portionen desselben Organbreies.

Reihe XIII. Kalbsleber. Wie in Reihe X. Zunahme um 36 %.

Reihe XIV. Ausführlich bereits besprochen.

Reihe XV. Lebern von vier Rinderfoeten. Längeres Erhitzen ergab geringe Abnahme der Ausbeute.

Reihe XVI. Muskulatur der Rinderfoeten. Längeres Erhitzen ergab Abnahme der Ausbeute.

Bei allen Versuchen fehlen nähere Angaben über die Art des benutzten Filtrierpapiers und über Trübung oder Klarheit der Filtrate, wodurch die Beurteilung der Versuche im einzelnen erschwert wird.

Der wesentliche Fehler in der Anlage der Nerking'schen Versuche ist folgender: Es ist der absolute Glykogengehalt der miteinander zu vergleichenden Lösungen nicht bestimmt worden, ehe der Einfluss der Kochdauer untersucht wurde. Das war nötig, weil die als gleich vorausgesetzten Lösungen meist schon ursprünglich verschieden waren.

C.

Nerking¹⁾ hat endlich zu zeigen geglaubt, dass das Glykogen selbst durch noch so lange fortgesetzte Extraktion mit siedendem Wasser weder aus der Leber noch aus den Muskeln gewonnen werden könne, so dass der so nicht ausziehbare, in den ausgekochten Organen verbleibende Glykogenrückstand als chemisch gebunden betrachtet werden müsse. Pflüger²⁾ hat in seiner zusammenfassenden Arbeit über das Glykogen die hier in Betracht kommenden Verhältnisse folgendermassen charakterisiert:

Er schreibt: „Richard Külz berichtete 1886, dass nach „anhaltender energischer Extraktion des Muskels mit Wasser im „Dampftopfe unter Umständen noch etwa 25 % der Gesamtmenge „des Glykogenes im Fleischrückstande verbleiben, die man erst mit „Hilfe der Kalimethode gewinnen kann“.

„R. Külz hat die zwei Arten von Glykogen hierdurch nicht „bewiesen, weil er zu zeigen versäumte, dass eine beträchtliche Ver- „längerung der Kochdauer mit Wasser nicht die Gewinnung von „mehr Glykogen ermöglicht. Die Behauptung, dass ein Teil des „Glykogenes nicht durch Kochen des Wassers, sondern nur durch „Kalilauge ausziehbar ist, tritt noch öfter auf. So bei F. W. Pavy, „bei A. Panormow, bei Cavazzani, bei Austin.

„Am eingehendsten ist die Frage durch Dr. J. Nerking unter- „sucht worden. Nerking hat 745 g der zerkleinerten Leber vom Kalbe „18 mal je 24 Stunden mit immer frischen Wassermengen auskochen „müssen, obwohl er nach jeder Auskochung den ausgepressten Brei „immer aufs neue pulverisierte. Der 18. Auszug ergab nach Ab- „scheidung der Eiweissstoffe mit Brücke's Reagens und Versetzen „mit dem doppelten Volum 96 %igen Alkohols keine Spur von „Trübung mehr, selbst nach dreitägigem Stehen nicht. Trotzdem „wurde das ausgepresste und auf dem Wasserbad getrocknete „Pulver nochmals mit 1000 ccm Wasser in der Porzellanschale über „freier Flamme $\frac{3}{4}$ Stunden ausgekocht, aber mit vollkommen nega- „tivem Erfolg. Darnach wurde das Pulver auf dem Wasserbad ge- „trocknet und mit Kalilauge von 1 % bis zur Lösung erhitzt, was „zwei Stunden in Anspruch nahm. Aus dieser Lösung konnten er- „hebliche Mengen von Glykogen gefällt werden, die durch Kochen

1) Pflüger's Arch. Bd. 81 S. 636 ff.

2) Pflüger's Arch. Bd. 96 S. 21 ff.

„mit verdünnter Salzsäure in Zucker übergeführt wurden, welcher „gravimetrisch bestimmt wurde. Es ergab sich, dass 24,9 % der „Gesamtmenge des Glykogenes nicht durch Wasser, nur durch Kali- „lauge ausziehbar waren. Die absolute Menge der 24,9 % war 1,8572 g „Glykogen in dem gesamten ausgekochten Rückstande.

„In einem zweiten Versuche, der genau auf dieselbe sorgfältige „Weise und zwar auch mit Kalbsleber angestellt wurde, waren sogar „76,4 % erst durch Behandlung mit KOH, nicht durch Wasser aus- „ziehbar. Durch blosses Auskochen mit Wasser erhielt man also „nur den vierten Teil des in der Leber enthaltenen Glykogenes. „Es ist also unter Umständen nicht wenig, sondern sehr viel Glykogen, „von dem man trotz feinsten Pulverisierung durch Auskochen mit „Wasser keine Spur mehr erhalten kann.

„Nerking dehnte seine Untersuchungen auch auf die Muskeln „aus und giebt folgende Übersicht der erhaltenen Ergebnisse:

Material	Angewandte Menge in g	Durch Wasser- extraktion ge- wonnenes Gly- kogen in g	Durch Kali- aufschliessung gewonnenes Glykogen in g	Gesamt- Glykogen in %
Kalbfleisch . . .	1000	3,8800	1,4688	0,5349
Kalbfleisch . . .	1000	2,6535	1,3122	0,3966
Herzmuskel vom Hammel	200	0,5100	0,1014	0,3057

Material	Wasser- lösliches Gly- kogen in %	Durch Kali auf- geschlossenenes Glykogen in %	Menge d. wasser- löslichen Gly- kogenes in % der Gesamt- glykogenmenge	Menge des durch Kali aufgeschlossenen Glykogenes in % der Gesamtglykogen- menge.
Kalbfleisch . .	0,3880	0,1469	72,53	27,47
Kalbfleisch . .	0,2654	0,1312	66,92	33,08
Herzmuskel vom Hammel	0,2550	0,0507	83,42	16,58

„Es ist wichtig, darüber sich zu verständigen, ob diese Versuche „beweisen, dass der mit siedendem Wasser nicht ausziehbare Teil „des Glykogenes als chemisch gebunden angesehen werden muss.

„Man hat allerdings in Betracht zu ziehen, dass die letzten Reste „des mit Wasser ausziehbaren Glykogenes in der That auch äusserst „schwierig erhalten werden, da unter Umständen ein 18 Tage

„dauerndes Auskochen nötig war, wobei die Ausbeuten von Tag zu Tag kleiner wurden. Sehr begünstigt wird die Vermehrung der „Ausbeute durch erneutes Pulverisieren. Es wäre nun denkbar, dass „ein Pulver, das durch sehr vielfach angewandtes Pulverisieren bereits eine sehr grosse Feinheit erlangt hat, einen Grenzzustand erreicht, so dass erneutes Pulverisieren keine weitere Vermehrung der „Feinheit des Pulvers mehr bedingt. Hierdurch wäre dann das in „den Stäubchen eingemauerte Glykogen vor Extraktion gesichert. „Dieser physikalische Grund zur Erklärung des nicht mit siedendem „Wasser ausziehbaren Glykogenes ist vorderhand in strenger Weise „nicht zu widerlegen.“

Besonders hervorzuheben bleibt, dass nach Nerking's eigenen Versuchen die zur Gewinnung des freien Glykogens notwendige Kochdauer ganz ausserordentlich verschieden ist. Bald genügten 8—10 Tage, bald waren 18 Tage notwendig, um schliesslich nach 24stündigem Kochen einen glykogenfreien Auszug zu erhalten. Nerking hat nun nicht versucht, ob er von den hartnäckig festsitzenden Resten nicht doch noch Teile erhalten haben würde, wenn er nicht 24, sondern vielmals 24 Stunden gekocht hätte.

Die Beurteilung dieser Verhältnisse wird in ein helleres Licht gerückt, wenn man Versuche anstellt, in denen freies, von Eiweissgerinseln eingeschlossenes Glykogen mit Wasser nach Nerking's Verfahren ausgekocht wird, um so festzustellen, ob freies Glykogen leicht wieder zu erhalten ist oder nicht.

Versuch.

Es wurden 1800 ccm aus Pferdeblut gewonnenen Serums mit 800 ccm einer 4,36 %igen Glykogenlösung gemischt und in offener Schale auf dem siedenden Wasserbade zur Gerinnung gebracht. Die viel Glykogen enthaltende Flüssigkeit wurde abgegossen, das geronnene Eiweiss fein zerkleinert, mit 1000 ccm destillierten Wasser versetzt und gekocht. Nach 24 Stunden wurde die Flüssigkeit abgegossen; das Eiweiss war gequollen und liess sich schlecht verreiben. Es wurden wieder 1000 ccm Wasser zugesetzt und die schwach alkalische Lösung durch Zusatz von Essigsäure auf schwach saure Reaktion gebracht. Nach weiteren 24 Stunden wurde wieder die Flüssigkeit abfiltriert, der nun leicht zerreibbare Rückstand in der Presse ausgedrückt, pulverisiert und wieder mit 1000 ccm Wasser versetzt. In dieser Weise wurde fünf Tage fortgefahren; dann wurde

das Auspressen unterlassen und bloss täglich zerrieben und das Wasser erneuert. Nach neuntägigem Kochen war noch nach Brücke Glykogen im Extrakt nachzuweisen. Am 13. Tage trat nach Ausfällen des reichlich gelösten Eiweisses mit dem Brücke'schen Reagens keine Alkoholfällung mehr ein. Der Eiweissrückstand wog ziemlich trocken 62 g; er wurde in 400 ccm 30 %iger siedender Kalilauge eingetragen und drei Stunden gekocht. Die so erhaltene Lösung gab nach Verdünnung auf KOH 15 % mit 1 Vol. Alkohol einen Niederschlag, der sich in Wasser gelöst durch intensive Jodreaktion als Glykogen erwies.

Der Versuch beweist, dass ein mechanisch in Eiweiss eingeschlossenes Glykogen der Extraktion mit heissem Wasser ähnliche Widerstände entgegensetzen vermag wie das natürlich in den Organen enthaltene. Dass dieses künstlich eingeschlossene Glykogen trotzdem wieder ausziehbar ist, beweisen zwei Versuche, in denen es mir bei dem einen gelang, aus dem mit einer konzentrierten Glykogenlösung koagulierten Eierklar von neun Eiern das Glykogen in 13 Tagen so vollständig auszuziehen, dass der mit KOH 30 % zerkochte Eiweissrückstand kein Glykogen mehr enthielt — in dem wässrigen Auszuge hatte schon am sechsten Tage die Jodreaktion versagt —; bei dem anderen Versuch waren 2000 ccm Pferdeblutserum mit 300 ccm einer konzentrierten Glykogenlösung auf offener Porzellanschale zum Koagulieren gebracht worden. Die derben Koagula wurden täglich abfiltriert, zerrieben und mit 1500 Wasser versetzt. Die wässrigen Auszüge wurden zum feineren Glykogenachweis auf ein kleines Volum eingedampft und dann mit der Jodmethode und nach Brücke auf Glykogen geprüft. Auf diese Weise gelang es, bis zum 15. Tage Glykogen im Auszuge nachzuweisen. Trotzdem dann alle Reactionen auf Glykogen versagten, wurde noch bis zum 21. Tage weitergekocht; dann wurde der Rückstand, ein feines Pulver, abfiltriert. Er wog nach Abpressen der Flüssigkeit 81 g. (Bei diesem wie bei den beiden vorhergehenden Versuchen war bis zum letzten Auszug jedesmal eine nicht unbedeutende Menge Eiweiss in Lösung gegangen.) Der Rückstand wird versetzt mit 200 ccm Wasser und 200 ccm KOH 60 % und fünf Stunden gekocht. Die Lösung wird durch Glaswolle filtriert, auf 500 ccm aufgefüllt und mit 500 ccm Alkohol 96 % versetzt. Es fällt ein reichlicher Niederschlag, der abfiltriert und gewaschen wird. Es lässt

sich darin keine Spur von Glykogen mehr nachweisen. Immerhin erhellt die Zähigkeit, mit der das Glykogen mechanisch festgehalten wurde, aus dem Umstande, dass sich bis zum 15. Tage mit Bestimmtheit Glykogen im wässrigen Auszug nachweisen liess. Der Grund dafür, dass es diesmal gelang, das Glykogen aus dem koagulierten Pferdeserum vollständig wieder auszuziehen, ist darin zu suchen, dass in diesem Versuch der Glykogennachweis dadurch, dass die wässrigen Auszüge auf ein kleines Volum eingeeengt wurden, mit viel grösserer Genauigkeit und infolgedessen viel länger geführt werden konnte als bei dem erstbeschriebenen entsprechenden Versuche.

Diese Ergebnisse legen die Frage nahe, ob es nicht doch etwa gelänge, mit dieser Methode das Glykogen auch in den aus Organen gewonnenen Auszügen so lange nachzuweisen, bis eine vollständige Extraktion erreicht wäre. Es wurden also die Versuche, das Glykogen mit heissem Wasser aus Lebern auszuziehen, wiederholt, vor allem, da alle anderen Gründe, die für eine chemische Bindung eines Teils des Glykogens in den Organen sprachen, hinfällig geworden sind.

Versuche.

Der Glykogengehalt von drei Kalbslebern wurde nach Pflüger's Methode bestimmt: Leber I 0,107 %

Leber II 0,091 %

Leber III 1,574 %

Gleichzeitig wurden von den drei Lebern je 100 g Organbrei in 1000 ccm siedenden Wassers eingetragen und ausgekocht. Es wurde also diesmal verhältnismässig sehr viel mehr Wasser benutzt, als dies bei den Nerking'schen Versuchen der Fall war. Die Flüssigkeit wurde täglich abfiltriert und der Organrückstand täglich aufs neue mit Quarzsand im Mörser verrieben, was ebenfalls früher nicht in Anwendung gezogen worden ist, aber die Feinheit der Pulverisierung vergrössert. Der wässrige Auszug der Leber III, die weitaus den grössten Glykogengehalt besass, wurde eingedampft bis auf ca. 200 ccm und sowohl mit der Jodmethode als nach Brücke auf Glykogen geprüft. Am 18. Tage war kein Glykogen mehr in dem Auszuge nachweisbar; am 20. Tage wurde in allen drei Auszügen nach Einengen und Ausfällen des noch immer in Lösung gegangenen Eiweisses noch einmal auf Glykogen geprüft und, als kein Glykogennachweis mehr möglich war, am 21. Tage der Rückstand in konzentrierter Kalilauge von 30 % drei Stunden gekocht. Die Organ-

lösung wurde auf das Doppelte verdünnt und mit 1 Vol. Alkohol 96 % ausgefällt. Der dabei entstehende Niederschlag wurde abfiltriert, mit Pflüger'scher Waschlösung und Alkohol absolut. gewaschen, dann in Wasser gelöst. Ein grosser Teil in Wasser unlöslicher Substanz blieb auf dem Filter zurück. Die Prüfung der Lösung auf Glykogen mit der Jodreaktion fiel in allen drei Fällen negativ aus, ebenso eine nach Inversion mit HCl vorgenommene Probe auf das Vermögen, Allihn'sche Lösung zu reduzieren.

Herr Geheimrat Pflüger hatte die Freundlichkeit, die Glykogenanalyse des 21 Tage ausgekochten Leberbreis und der ausgekochten Eiweissrückstände in diesen Versuchen selbst auszuführen. Es wurden also die Rückstände wie sonst in 30 %iger Kalilauge gelöst und wie bei einer Glykogenanalyse weiter verfahren, unter Berücksichtigung seiner neuesten Verbesserung des Glykogennachweises mit der Jodreaktion¹⁾. Bemerkenswert blieb, dass auch nicht einmal eine Spur von Glykogen mehr nachgewiesen werden konnte, obwohl die Auszüge, welche das Glykogen enthalten mussten, auf ein möglichst kleines Volum eingedampft worden waren.

Es ist also alles Glykogen durch Ausziehen mit heissem Wasser erhalten worden.

Der Grund für die Schwierigkeit des Ausziehens liegt wohl in folgenden, schon von W. Saake²⁾ ausführlich behandelten Thatsachen. Mikroskopische Untersuchungen lehren uns, dass das Glykogen innerhalb der Zellen liegt. Da nun aber das Glykogen sehr schwer durch tierische Membranen diffundiert, so wird es auch die unverletzten Zellwände nur äusserst langsam durchdringen können. Ganz besonders gross werden die gebotenen Schwierigkeiten dann sein, wenn das Eiweiss auch noch durch Hitze, Alkohol oder andere Agentien zur Koagulation gebracht worden ist. Als Beweis dafür führt Saake an, dass Methoden, die zur Sprengung der Zellen führen, wie die Behandlung mit Trichloressigsäure oder das Gefrierlassen und Wiederauftauen der Organe, rasch eine relativ grosse Ausbeute an Glykogen ergeben. Dass man bei diesen Methoden nicht die theoretischen Werte erhält, liegt wohl hauptsächlich in der Schwierigkeit, das in Freiheit gesetzte Glykogen vom Eiweiss zu trennen, da bei dem Versuche, abzufiltrieren, das Eiweiss rasch die Filter verstopft und Glykogen zurückhält.

1) Pflüger's Arch. Bd. 102 S. 305 ff.

2) Zeitschr. f. Biol. Bd. 29. 1892. S. 474 ff.

§ 4. Ergebnisse.

I. Aus einer durch Kochen mit verdünnter Kalilauge dargestellten Leberlösung lässt sich nach vollständigem Ausfällen des darin enthaltenen freien Glykogenes durch längeres Kochen kein weiteres Glykogen abspalten.

II. Bei längerem Kochen mit verdünnter Kalilauge wird ein Teil des Glykogenes löslicher in Alkohol. Die dadurch bei Fällungen mit JK und $\frac{1}{2}$ Vol. Alkohol eintretenden Verluste betragen bei 130stündiger Kochdauer bis zu 6% des mit 1 Vol. Alkohol 96% fällbaren Glykogenes.

III. Längeres Kochen eines glykogenhaltigen Organes mit verdünnter Kalilauge bedingt nach einmal eingetretener Lösung immer einen Verlust, nie einen Zuwachs an Glykogen. Die Ergebnisse J. Nerking's sind darin begründet, dass er

1. stets zur Vergleichung **verschiedene** Fraktionen des Filtrates derselben Organlösung benutzte, und dass diese Fraktionen **immer verschiedenen Glykogenehalt** haben und dass er zum längeren Kochen die an Glykogen reichere wählte, oder dass er

2. zwei Portionen desselben Leberbreies **verschieden lange** in verdünnter Lauge kochte, also **verschieden getrübt** Filtrate erhielt, welche immer einen **verschiedenen Glykogenehalt** aufweisen. Da mit verdünnter KOH-Lauge länger gekochte Leberlösungen ärmer an Glykogen werden, aber bei der Filtration weniger Glykogen verlieren, sind zwei entgegengesetzt wirkende Momente da, welche Nerking's inkonstante Ergebnisse bedingt haben.

IV. Sowohl von Natur in der Leber befindliches als auch künstlich in geronnenes Eiweiss eingeschlossenes Organglykogen lässt sich durch kochendes Wasser sehr schwer, aber bei genügend lange (21 Tage und Nächte) fortgesetztem Kochen und energischer mechanischer Zerkleinerung doch vollständig ausziehen.

V. Es besteht augenblicklich keine Thatsache mehr, die für die Annahme chemisch gebundenen Glykogenes spricht.

Herrn Professor E. Pflüger, sage ich für die mir durch Rat und Tat gewährte Unterstützung meinen herzlichsten Dank. Auch Herrn Professor Schöndorff bin ich zu Dank verpflichtet.
