

(Physiologisches Laboratorium der Universität Bonn.)

Die Bestimmung des Glykogenes nach A. E. Austin

beurtheilt von

E. Pflüger.

§ 1. Die Aufgabe.

Von dem Wunsche geleitet, an Stelle der mangelhaften Methode von R. Külz eine bessere zu setzen, hat A. E. Austin¹⁾ auf Veranlassung und unter Leitung von Prof. E. Salkowsky ein neues Verfahren zur Bestimmung des Glykogenes ausgearbeitet, welches ich für meine Untersuchungen einer Prüfung unterwerfen musste.

Salkowsky's Gedanke bezweckte in erster Linie, die Schädigung zu vermeiden, welche das Glykogen durch das Kochen mit Kalilauge bei der Külz'schen Methode erleidet und gleichzeitig die Erzeugung der massigen Eiweissniederschläge zu umgehen, welche das Glykogen mechanisch mit niederreißen.

Demgemäss sollte der auf Glykogen zu untersuchende Organbrei zuerst mit siedendem Wasser ausgezogen und das in dem ausgekochten und ausgepressten Rückstand noch enthaltene Glykogen durch Pepsinverdauung aufgeschlossen werden.

Austin's Verfahren²⁾ ist nun folgendes:

„Zur Verdauung diene ein aus 2 g Finzelberg'schem Pepsin, „welches vor der Anwendung durch Waschen mit Wasser sorgfältig „von jeder Spur Milchzucker befreit war, und 1 Liter Verdauungs- „salzsäure (hergestellt aus 990 ccm Wasser und 10 ccm Salzsäure von „25 % HCl) bereiteter künstlicher Magensaft. Derselbe befand sich „in einer Glasstöpselflasche; die beim Auskochen mit Wasser ge- „bliebenen Rückstände wurden in diese hineingebracht und das

1) A. E. Austin, M. D. aus Boston U. S. A., Ueber die quantitative Bestimmung des Glykogenes in der Leber (aus dem chemischen Laboratorium des pathologischen Instituts zu Berlin). Virchow's Archiv Bd. 150 S. 185. 1897.

2) Austin, a. a. O. S. 192.

„Ganze unter vielfachem Schütteln so lange bei 40° C. digerirt, bis „anscheinend Alles verdaut war, was in der Regel zwei Tage in „Anspruch nahm. Nunmehr wurde der Inhalt der Flasche in eine „grosse Schale entleert, neutralisirt und auf 200 ccm eingedampft, „nochmals mit Salzsäure angesäuert, die Flüssigkeit heiss filtrirt und „etwas nachgewaschen. Das Filtrat, welches stets ziemlich stark „gefärbt war, wurde mit dem doppelten Volum Alkohol versetzt und „über Nacht stehen gelassen, der Niederschlag abfiltrirt, mit 62pro- „centigem Alkohol nachgewaschen, dann noch feucht sammt dem „Filter in eine Schale gebracht und unter Zusatz von wenig Wasser „auf dem Wasserbad erwärmt. Dabei löste sich der Niederschlag „bis auf einen geringen Rückstand auf, welcher abfiltrirt und mit „dem bei der Verdauung gebliebenen Rückstand behufs Verarbeitung „nach Kütz vereinigt wurde. Das Filtrat nebst Waschwasser wurde „in der gewöhnlichen Weise mit Salzsäure und Brücke'schem „Reagens gefällt, filtrirt u. s. w.“

Fassen wir das Verfahren Austin's übersichtlich zusammen, so wird das Glykogen durch drei aufeinander folgende verschiedene Methoden gewonnen, die mit A, B, C bezeichnet werden. A liefert das Glykogen, welches durch Kochen mit Wasser dem Organbrei entzogen werden kann. Die mit dem Glykogen in Lösung gegangenen Eiweissstoffe u. s. w. werden mit dem Brücke'schen Reagens ausgefällt. Der Niederschlag ist bei Weitem nicht so massig wie bei dem Kütz'schen Verfahren.

B liefert durch Verdauung des ausgekochten Organbreies das in diesem noch enthaltene und durch Auskochen nicht zu gewinnende Glykogen. Das mit dem verdauten Eiweiss gleichzeitig in Lösung gegangene Glykogen wird nun fast allein ohne das Eiweiss gefällt, wenn die Concentration der Lösung die von Austin vorgeschriebene Stärke nicht überschreitet und auf 1 Volum angesäuertes Glykogen-Albumoselösung immer 2 Volumina Alkohol angewandt werden. Austin meint offenbar nicht absoluten Alkohol, sondern solchen von 96 Vol. Procent. — Da aber diesem durch Verdauung gewonnenen Glykogen doch ein wenig Eiweiss beigemischt ist, wird die Anwendung des Brücke'schen Reagens noch nöthig.

C liefert das Glykogen, welches in dem unverdaut gebliebenen Rest des Organbreies noch eingeschlossen ist; deshalb wird dieser Rest mit Kalilauge zerkoht, gelöst und nach Kütz's Vorschriften verfahren.

Folgende Tabelle gibt einen Beleg für die Ergebnisse des Verfahrens (s. Austin a. a. O. S. 193).

Tabelle I.

Versuchs-Nr.	Gewicht der Leber	A Mit Wasser aus-gezogen	B Aus dem Rückstand durch Ver-dauung erhalten	C Aus dem Ver-dauungs-rückstand nach Kälz erhalten	Summe von A+B+C	Control-bestimmung nach Kälz	Die Verdauungs-methode hat	
							mehr	weniger
							geliefert als Kälz	
1	25,6	0,558	0,4445	0,0195	1,0220	0,991	0,031	—
2	22,5	0,3128	0,250	0,009	0,5118	0,561	0,108	—
3	42,0	2,0835	0,735	0,065	2,8825	2,9414	—	0,058
4	20,5	0,0105	0,022	Spur	0,0325	0,0374	—	0,0049
5	19,25	0,258	0,3295	Spur	0,5875	0,535	0,0525	—
6	31	0,598	0,552	0,0115	1,1615	1,233	—	0,0715
7	30,45	0,9065	0,619	0,017	1,5425	1,486	0,0565	—

Um die Bedeutung der Zahlen besser beurtheilen zu können, wird es nothwendig sein, aus Austin's Tabelle eine andere Tabelle abzuleiten, in welcher berechnet ist, wie gross der procentige Fehler bei Austin's Analysen sich herausstellt, wenn man die nach Kälz ausgeführten Analysen als richtig ansieht.

Tabelle II.

Versuchs-nummer	Control-bestimmung nach Kälz	Die Verdauungsmethode hat absolut		Die Verdauungsmethode hat procentisch	
		mehr	weniger	mehr	weniger
		geliefert als Kälz		geliefert als Kälz	
1	0,991	0,031	—	3,13	—
2	0,561	0,108	—	19,25	—
3	2,9414	—	0,058	—	1,97
4	0,0374	—	0,0049	—	13,10
5	0,535	0,0525	—	9,8	—
6	1,233	—	0,0715	—	5,8
7	1,486	0,0565	—	3,8	—

Allgemeines Mittel + 2,16

Aus den Angaben Austin's lässt sich nicht mit Sicherheit ersehen, ob die Versuche, die der mitgetheilten Tabelle zu Grunde liegen, mit oder ohne Aschenbestimmung ausgeführt sind. Es scheint,

dass keine Aschenbestimmungen gemacht sind. Denn wo Austin¹⁾ Aschenanalysen gemacht hat, gibt er es ausdrücklich an mit der Bemerkung, dass er nicht überall Aschenbestimmungen ausgeführt habe, da ihr Betrag so geringfügig sei. Külz pflegte solche Analysen einfach als werthlos zu verwerfen. Die Glykogen-Analyse ist aber auch nach Külz so ungenau und bei sonst gewissenhafter Arbeit mit grösseren Fehlern behaftet, als sie durch Vernachlässigung der Mineralbestandtheile entstehen können. Desshalb lässt sich diese Vereinfachung der immer noch unglaublich mühsamen Arbeiten allenfalls entschuldigen.

Zunächst ist nun allerdings aus der Tabelle die wenig befriedigende Thatsache ersichtlich, dass die Verdauungsmethode bald 1,97 % weniger, bald 19,25 % mehr Glykogen liefert als die Külz'sche. Da ich²⁾ gezeigt habe, dass die letztere ebenfalls mit einem wechselnden und oft sehr grossen Beobachtungsfehler behaftet ist, kann man die Mangelhaftigkeit in der Uebereinstimmung der beiden Methoden keineswegs der Verdauungsmethode allein zur Last legen.

Von Wichtigkeit bleibt aber, dass im Mittel die Verdauungsmethode ungefähr dieselben Werthe wie die Külz'sche ergibt. Im Mittel liefert die Verdauungsmethode um 2,16 % höhere Werthe. Da ich³⁾ nun bewiesen habe, dass die mit der Methode von Külz erhaltenen Werthe viel zu klein sind, muss dies auch für die Verdauungsmethode gelten.

Ich möchte nun aber trotz der grossen Mangelhaftigkeit der Külz'schen Methode nicht alle die vielen Untersuchungen, welche mit ihrer Hülfe angestellt sind, für ganz werthlos halten. Wo es sich um vergleichende Bestimmungen handelt, die sämmtlich nach denselben Vorschriften und von denselben Analytikern ausgeführt worden sind, wird man annehmen dürfen, dass das Vorzeichen der gefundenen Unterschiede richtig ist, wenn auch den absoluten Zahlen ein nur bedingter Werth zukommt. Ob es sich um mehr oder weniger Glykogen handelt, wird man nun vermuthlich auch mit der Verdauungsmethode ermitteln können. Da wir bis heute noch keine Methode zur Bestimmung des Glykogens haben, welche unbestritten sichere absolute Werthe liefert, und da die Verdauungsmethode einige

1) Virchow's Archiv Bd. 150 S. 188.

2) Dieses Archiv Bd. 75 S. 120.

3) Dieses Archiv Bd. 75 S. 121.

Vortheile vor anderen Methoden voraus hat, so schien es mir der Mühe werth, sie etwas eingehender zu prüfen.

Ich will an einem Beispiele jene Vortheile erläutern, die in meinem Laboratorium sich thatsächlich bewährt haben.

Wenn die Aufgabe gestellt ist, zu bestimmen, wie viel Stickstoff, Fett und Glykogen in einer bestimmten Gruppe von etwa 20 Fröschen enthalten ist, so stösst man zuerst auf die Schwierigkeit, vielleicht Unmöglichkeit, sämtliche Thiere in einen homogenen Brei zu verwandeln. Man kann desshalb nicht aliquote Theile des Breies abwägen, um in dem ersten Theil den Stickstoff, im zweiten das Fett, im dritten das Glykogen zu bestimmen. — Man kann auch nicht sämtliche 20 Frösche in siedende Lauge werfen, die sie schnell auflöst; denn die Lauge treibt Ammoniak aus und verseift die Fette. Hierdurch ist die Külz'sche Methode ausgeschlossen. — Wenn man aber alle 20 Frösche in einer grossen Flasche in Pepsinsalzsäure verdaut, erhält man eine homogene Lösung der Thiere — abgesehen von den Knochen und einem geringen Rückstand. Diese Lösung enthält noch allen Stickstoff, alles Fett und gestattet die Bestimmung des Glykogenes nach Austin. J. Athanasiu¹⁾ hat sich ja dieser Methode bedient, um die durch Phosphor angeblich erzeugte fette Entartung der Eiweissgewebe zu erforschen. Die Arbeit, welche ich hier mittheile, ist von mir (1897 u. 1898) ausgeführt worden, ehe Athanasiu in meinem Laboratorium arbeitete, so dass er meine Erfahrungen benutzen konnte. Andere Untersuchungen haben mir keine Zeit gelassen, das hier Mitzutheilende früher zu veröffentlichen. Dies erklärt auch, wesshalb Methoden gebraucht wurden, die ich seitdem durch bessere ersetzt habe.

§ 2. Wird das verwandte Pepsinum Finzelberg bei der Gewinnung des Glykogenes durch das Brücke'sche Reagens vollkommen ausgefällt?

Meine erste Aufgabe musste darin bestehen, zu untersuchen, ob das Pepsinum Finzelberg vollständig durch das Brücke'sche Reagens ausgefällt wird und ob, falls das nicht der Fall ist, der Alkohol dann bei der Fällung des Glykogenes auch einen Theil des Pepsinum Finzelberg mit niederschlägt. Ich stellte diese Ver-

1) Dieses Archiv Bd. 71 S. 318. 1898.

suche mit 4 Präparaten des Pepsinum Finzelberg an, die nicht ganz gleich sich verhielten, also von verschiedenen Darstellungen herrührten.

Präparat A war von der Fabrik unmittelbar bezogen und auf meinen Wunsch nicht mit Milchzucker verrieben. Die Fabrik nennt es Pepsinum absolutum Nr. 1.

Präparat B, ebenfalls von der Fabrik unmittelbar bezogen und nicht mit Milchzucker verrieben, unterscheidet sich von A durch viel grössere Löslichkeit in Wasser. Die Fabrik nennt dieses Präparat Pepsinum Finzelberg absolutum Nr. 2.

Präparat C ist ein mit Milchzucker verriebenes Präparat, wie es auch von Austin angewandt und vor dem Gebrauche durch Auswaschen von dem Zucker befreit worden ist. Dieses Präparat wurde aus der Flora-Apotheke in Poppelsdorf bezogen und von der Fabrik als ihr Präparat anerkannt.

Präparat D ist ein mit Milchzucker verriebenes Pulver, welches von der Fabrik unmittelbar bezogen worden ist. — Mit diesen 4 Präparaten stellte ich nun blinde Versuche an; der nach Austin's Vorschrift hergestellte künstliche Magensaft wurde allein — ohne Zusatz von Organbrei — 2 bis 3 Tage auf 38° C. erwärmt und dann untersucht, ob nach Fällung der Pepsinlösung in dem Filtrat hiervon Stoffe enthalten sind, welche durch Weingeist wie Glykogen gefällt werden.

Analyse I.

Pepsinum Finzelberg absolutum Nr. 1 (Präparat A), und zwar 0,5 g wird mit 1 Liter Salzsäure von 0,25 % 2 1/2 Tage bei 38° C. der Verdauung unterworfen. Nach Abschluss der Verdauung neutralisierte ich die Lösung mit Soda bis zu schwach alkalischer Reaction und dampfte auf 200 ccm ein. Dann neutralisirte ich mit Salzsäure und fällte mit Kaliumquecksilberjodid und Salzsäure, wodurch flockige Niederschläge entstehen, die oft schlecht filtriren. Das Filter wurde 3 mal mit verdünntem Brücke'schen Reagens gewaschen und das ein wenig opalisirende Filtrat mit 2 Volumina Alkohol von 96 % versetzt. Hierbei entstand eine etwas stärkere Opalescenz. Ich liess das Becherglas bedeckt ruhig 8 Tage stehen und bestimmte den Niederschlag; er wog:

0,0145 g.

Analyse II.

Dieser Versuch wurde genau so wie Analyse 1 ausgeführt und 0,5 g des Pepsinum Finzelberg Nr. 2 (Präparat B) benutzt.

Diesmal war durch die Alkoholfällung eine ziemlich starke Opalescenz des Filtrates entstanden, und in 7 Tagen hatte sich am Boden eine durchsichtige fest anhaftende Schicht abgesetzt. Genau so verhält sich bei der Verdauungsmethode Austin's das durch Alkohol sich abscheidende Glykogen. Als ich dann absoluten Alkohol auf den am Glas festhaftenden Belag goss, wurde derselbe weiss und undurchsichtig und löste sich, durch die Wasser entziehende Kraft des Alkohols schrumpflös, in einer Reihe von Stunden von selbst in Gestalt dünner Blätter vom Glase ab. Das ist ganz das Verhalten des Glykogenes, wie ich es oft bei der Methode Austin's zu beobachten Gelegenheit hatte. Nach der Einwirkung des Alkohols lässt sich nun der Niederschlag auf das quantitative Filter bringen. Ich fand den ungeheuer grossen Werth von

0,090 g.

Ich nenne den Werth ungeheuer gross, da er gleich Null sein sollte, und da es sich um eine quantitative Analyse handelt. Da mir das ganze Verhalten der gewonnenen Substanz den Eindruck machen musste, dass ich es mit Glykogen zu thun hatte, löste ich einen Theil in Wasser und bereitete eine Jodlösung, die sehr schwach gelblich wie weisser Wein aussah. Als ich die Lösung des aus dem Pepsinum Finzelberg stammenden Körpers hinzugoss, entstand burgunderrothe Farbe. — Da die Masse des „Glykogenes“ in dem Pepsinum absolutum Finzelberg Nr. 2 so gross war, hoffte ich, dass ich die Jodglykogenreaction unmittelbar erhalten würde, wenn ich ohne Weiteres eine Lösung des Pepsines Nr. 2 in Wasser in beschriebener Art mit der Jodlösung prüfte. Ich hatte in der That einen sehr schlagenden Erfolg.

In Folge dieses Versuches präparirte ich die isolirten Magenschleimhäute mehrerer Kaninchen, die längere Zeit gut mit Getreidekörnern gefüttert worden waren. Ich untersuchte nach Külz auf Glykogen, erhielt aber kaum eine Spur.

Ich vermute desshalb, dass in dem Präparat durch die Einwirkung eines Fermentes in Erythramylon verwandeltes Stärkemehl enthalten war.

Bemerkenswerth bleibt, dass dieses Präparat als „absolutum“

von der Fabrik bezeichnet wird, also keinen Zusatz erhalten haben soll. Ich habe dieses Präparat, wie schon erwähnt, von der Fabrik unmittelbar bezogen.

Es war mir demgemäss von Interesse zu ersehen, dass auch andere Forscher ähnliche Erfahrungen mit den käuflichen Pepsinpräparaten gemacht haben. So berichtet S. Fränkel¹⁾ in einer Arbeit über die Spaltungsproducte des Eiweisses bei der Verdauung:

„Das Pepsin muss sehr sorgfältig für solche Versuche gereinigt werden. Die käuflichen Präparate werden zumeist mit Stärke oder Milchzucker beschwert und haltbar gemacht. Ich verwendete nach Durchprüfung verschiedener Präparate sogenanntes Pepsinum absolutum (Finzelberg) und Pepsinum crystallis (Parke, Davis & Co.). Es müssen auch diese Präparate durch Dialyse gereinigt werden, nachdem man sich vorher überzeugt, dass sie keine bei der Fabrication zugesetzten Kohlehydrate enthalten.“

Analyse III.

Dieser Versuch wird genau wie die vorhergehenden angestellt mit 2 g des Pepsinpräparates C, das natürlich vorher mit Wasser von dem Zucker befreit worden war. Nach Fällung mit dem Brücke'schen Reagens wurde ein Filtrat erhalten, dass fast keine Opalescenz zeigte. Ebenso erzeugte der Zusatz von 2 Volumina Alkohol von 96 % eine nur sehr schwache Trübung. Gleichwohl hat sich nach acht Tagen eine Substanz abgeschieden, deren Gewicht beträgt:

0,009 g.

Analyse IV.

Der Versuch wird genau wie Analyse III ausgeführt. Es wurden angewandt 2 g Pepsinum Finzelberg des Präparates D, das unmittelbar aus der Fabrik bezogen und durch Waschen mit Wasser von seinem Zucker befreit worden war. Nach Zusatz des Brücke'schen Reagens tritt starke flockige Fällung ein. Das Filtrat hiervon war sehr schwach opalisirend. Der Alkoholzusatz erzeugte auch nur eine sehr geringe Trübung. Nach sieben Tagen hat sich aber ein Niederschlag abgesetzt, der getrocknet

0,013 g

wiegt und eine schwache Glykogenreaction gibt.

1) S. Fränkel, Sitzungsber. d. k. Akademie der Wissenschaften in Wien. Mathem.-naturw. Classe Bd. 107 Abth. 2 b. Dec. 1898. — S. 11 d. Sep.-Abdr.

Aus diesen Analysen folgt, dass das Pepsinum Finzelberg Körper enthält, welche wie das Glykogen wohl durch Alkohol, nicht aber durch Salzsäure und das Brücke'sche Reagens gefällt werden. Diese Stoffe müssen demgemäss bei der Austin'schen Analyse das Gewicht des zu bestimmenden Glykogenes in fehlerhafter Weise beeinflussen und zwar steigern. Der Fehler ist von wechselnder Grösse und zuweilen sogar durch Glykogen oder Erythramylon bedingt, das nach Brücke bei der Magenverdauung aus Amylon entsteht.

Das Reagens, welches dazu auserwählt wurde, um in einer Substanz die Menge des Glykogenes zu bestimmen, enthält also selbst sehr wechselnde Mengen von Glykogen oder einem ähnlichen Polysaccharid.

§ 3. Uebt das Pepsinum Finzelberg auf Glykogen eine verändernde Wirkung aus, die sich in geringerer Fällbarkeit durch Alkohol kund gibt?

Austin hat sich natürlich auch die Frage vorgelegt, ob das Pepsin auf das Glykogen eine Einwirkung ausübe, welche es zur quantitativen Analyse unbrauchbar mache. Austin behauptet nun, dass das Pepsinum Finzelberg keinen Zucker aus Glykogen bei der künstlichen Verdauung erzeuge. Ich habe diesen Versuch wiederholt und die Verdauung sogar drei Tage fortgesetzt, ohne dass mir der Nachweis einer Entstehung von Zucker gelungen wäre. Diese Thatsachen sind aber nicht genügend; es ist vielmehr der Beweis zu erbringen, dass die Pepsinverdauung das Glykogen nicht — etwa durch Bildung leichter löslicher Dextrine — in einer Weise verändert, die einen Fehler für die quantitative Analyse zur Folge hat.

Um diese Frage zu entscheiden, habe ich gewogene Glykogenmengen der Verdauung unterworfen, indem ich genau so verfuhr, wie es Austin für die quantitative Gewinnung des Glykogenes vorschreibt. Ich will gleich hier hervorheben, dass ich immer einen grossen Verlust zu verzeichnen hatte.

Um nun dem Einwande zu begegnen, dass mein Verfahren zur Wiedergewinnung einer bestimmten Menge aufgelösten Glykogenes ungenügend oder fehlerhaft gewesen sei, habe ich durch unmittelbare Versuche festgestellt, ob ich bei Ausschluss der Verdauung eine gewogene aufgelöste Menge Glykogenes wieder gewinnen könne, oder,

falls das nicht der Fall, wie gross der Verlust sei. Bei diesen Control-Analysen schloss ich Alles aus, was wesentlich mit Austin's Methode verknüpft ist; Nichts, was unwesentlich sich zu ihr verhält.

Also enthielt die Lösung des gewogenen Glykogenes im Controlversuch natürlich kein Pepsin. Die Lösung wurde nicht von 1000 auf 200 ccm nach Neutralisation abgedampft, wie das bei Austin's Methode geschehen muss.

Beim Controlversuch nahm ich also 200 ccm = 1,25 g Salzsäure, neutralisirte mit Soda, machte nach Zusatz der gewogenen Glykogenmenge mit Salzsäure sauer und fügte noch ein wenig Kaliumquecksilberjodid hinzu, wodurch natürlich keine Trübung entstand. Dann fällte ich mit 2 Volumina Alkohol von 96 % Tr., wie es Vorschrift ist.

Da es bei den hier anzustellenden Versuchen darauf ankam, ein Glykogen in der Hand zu haben, welches sich von dem in den Organen enthaltenen möglichst wenig unterscheidet, und da doch bei der Darstellung des Glykogenes mehr oder weniger eingreifende chemische Reagentien gebraucht werden, die ein Unverändertbleiben des ursprünglichen Glykogenes nicht verbürgen, so wählte ich auf verschiedene Art dargestellte Glykogene, um zu sehen, ob Unterschiede in den Analysen bemerkbar würden.

Serie I

betreffend die Pepsinverdauung des Glykogenes. In dieser Reihe wurde immer dasselbe Glykogenpräparat verwandt. Es war Glykogen aus Pferdefleisch und von mir nach der Methode von Brücke-Külz gewonnen worden. Ich hatte dasselbe mehrmals durch Wiederauflösen in Wasser, Fälln mit Brücke's Reagens u. s. w. gereinigt.

I. Stickstoffanalysen des Pferdeglykogenes:

Analyse I: 0,125 % Stickstoff (angewandt 1,4136 g Glykogen).

Analyse II: 0,130 % Stickstoff (angewandt 0,988 g Glykogen).

Mittel = 0,127 % Stickstoff.

II. Aschenanalysen des Pferdeglykogenes:

Analyse I: 0,98 % Asche (angewandt 0,9718 g Glykogen).

Analyse II: 0,88 % Asche (angewandt 1,411 g Glykogen).

Mittel = 0,93 % Asche.

III. Glykogenlösung von bekanntem Gehalt soll ohne Pepsinwirkung quantitativ analysirt werden:

Tabelle III.

	Angewandtes aschenfreies Glykogen	Gefundenes aschenfreies Glykogen	Verlust	
			absolut	in Procenten
Analyse I	0,7670	0,7645	0,0025	0,2
Analyse II	0,8285	0,7965	0,0320	3,8
Analyse III	0,4612	0,4487	0,0125	2,7
Analyse IV	0,5736	0,5595	0,0141	2,4
			Mittel	2,2 %

Tabelle IV.

IV. Glykogen wiederfinden nach 2¹/₂ tägiger Pepsinwirkung.

Nr.	Pepsin- präparat	Glykogen			Verlust	
		angewandt aschenfrei	gefunden aschenfrei	aschen- haltig	absolut	procentig
I	C	0,3984	0,2665	0,2695	0,1319	33,1
II	C	0,9854	0,7937	0,8025	0,1920	19,4
III	C	0,8589	0,6409	0,6480	0,1180	25,4
IV	C	0,3592	0,2628	0,2657	0,0964	26,9
V	D	0,5325	0,4940	0,4995	0,0385	7,2
VI	D	0,8248	0,7146	0,7226	0,110	13,3
VII	D	0,4939	0,4597	0,4648	0,0342	6,9

Die Analysen der mit Muskelglykogen vom Pferde ausgeführten Verdauungsversuche ergeben einen sehr grossen Verlust, der bei den verschiedenen Pepsinpräparaten sehr verschiedene Werthe hat. Am grössten ist der Fehlbetrag bei Pepsin C, wo es ¹/₄ bis ¹/₃ des zu bestimmenden Werthes ausmacht. Kleiner, aber doch noch beträchtlich erscheint der Fehlbetrag bei Präparat D.

Zuzugeben ist, dass allerdings auch ohne Verdauung ein Deficit vorhanden ist, welches aber im Mittel nur 2,2 % betrug, also sehr klein gegen das nach Einwirkung des Pepsines beobachtete sich erweist.

Dahingegen bleibt zu beachten, dass der wirkliche Fehlbetrag grösser ist, als wir ihn fanden, weil die Verunreinigung des Pepsines den Fehlbetrag theilweise compensirt.

Serie II.

In dieser Serie benutzte ich Glykogen, welches ich aus Kaninchenlebern nach der Methode von Austin gewonnen und durch mehrmaliges Wiederauflösen und Fällen möglichst gereinigt hatte.

I. Stickstoffgehalt des Leberglykogens vom Kaninchen = 0,033 %
angewandt = 4,308 g Glykogen.

II. Aschengehalt des Leberglykogens vom Kaninchen = 0,352 %
angewandt = 0,796 g Glykogen.

III. Die Lösung einer bekannten Menge des Leberglykogenes vom Kaninchen soll, ohne dass Pepsinwirkung im Spiele war, quantitativ analysirt werden. (Tab. V.)

IV. Das Glykogen, das nach Tab. V untersucht ist, wird der Pepsinverdauung unterworfen, um zu sehen, wieviel dabei verschwindet. (Tab. VI.)

Tabelle V.

Nummer der Analyse	Aschefreies Glykogen in Gramm		Verlust an aschefreiem Glykogen	
	angewandt	wiedergefunden	absolut	in Procent
I	1,189	1,154	0,035	2,9
II	0,5416	0,515	0,027	4,9

Tabelle VI.

Nummer der Analyse	Pepsinpräparat	Aschefreies Glykogen in Gramm		Aschehaltiges Glykogen wiedergefunden in Gramm	Verlust an aschefreiem Glykogen	
		angewandt	wiedergefunden		absolut	in Procenten
III	A	0,6237	0,583	0,5848	0,0407	6,5
IV	B	0,802	0,761	0,7672	0,041	5,1
V	C	1,009	0,823	0,828	0,186	18,4

Die Versuche der Serie II (Tab. V u. Tab. VI), welche mit dem durch Verdauung gewonnenen Glykogen gewonnen wurden, liefern im Allgemeinen dasselbe Ergebniss, wie wir es in Serie I beobachteten. Bemerkenswerth ist, dass hier das Pepsinpräparat A u. B den kleinsten, das C wie bei Serie I den grössten Fehlbetrag gibt. Das Pepsinpräparat B, welches bei Serie I nicht in Anwendung kam, zeigt den kleinsten Fehlbetrag natürlich, weil schon im angewandten Pepsinum Finzelberg eine beträchtliche Glykogenmenge vorhanden war.

Im Allgemeinen ist aber der Fehlbetrag bei dem Verdauungsglykogen, das noch einmal der Verdauung unterworfen wurde, kleiner als in Serie I. Nach Serie I scheint die Pepsinverdauung das Pepsin in ein leicht lösliches und schwerer lösliches Dextrin überzuführen. Dieses wird durch Weingeist von 60 % gefällt, jenes aber nicht. Verwendet man also gereinigtes Verdauungsglykogen und unterwirft es nochmals der Verdauung, so wirkt diese nur noch wenig ein, weil bereits die erste Verdauung die Abspaltung des löslichen Theiles bewirkt hat. Ich gebe diese Erklärung nur als eine hypothetische.

Die beiden ausgeführten Serien haben den Beweis geliefert, dass die Pepsinverdauungsmethode von Austin einen wechselnden, aber erheblichen Fehlbetrag bedingt, der nur theilweise dadurch ausgeglichen wird, dass das Pepsinum Finzelberg bald grössere, bald kleinere Mengen von Glykogen oder Amylum schon enthält und vielleicht noch andere Beiträge liefert.

§ 4. Das nach der Methode Austin's erhaltene Glykogen ist entgegen der Behauptung dieses Forschers nicht frei von Stickstoff.

Die in der Literatur seit der Entdeckung des Glykogenes immer wieder auftretende Behauptung, dass das dargestellte Glykogen frei von Stickstoff sei, hat ihren Grund in der nicht genügenden Empfindlichkeit der Proben auf Stickstoff. Wie ich mit meinen Schülern gezeigt habe, ist bis jetzt die quantitative Analyse des Stickstoffs nach Kjeldahl die einzig durchaus zuverlässige Probe, wenn man die zur Bindung des gebildeten Ammoniaks hergestellte Schwefelsäure so stellt, dass 1 ccm gleich 1 oder 2 Milligramm Stickstoff. Die zugehörige Kalilauge ist der Schwefelsäure äquivalent.

Selbstverständlich muss durch blinde Analysen festgestellt werden, dass die angewandten Reagentien keinen Stickstoff enthalten, sowie dass die Glasgefässe und das Glasrohr, welches zur Destillation des Ammoniaks dient, kein Alkali abgibt. — Selbstverständlich sind ferner endlich die Lösungen dadurch noch gesichert worden, dass der Stickstoff in gewogenen Mengen von Harnstoff bestimmt und ganz genau gefunden worden ist.

Wenn man bei der Analyse des Glykogenes nach Brücke-

Külz die Eiweissstoffe **nur einmal** mit Salzsäure und Kaliumquecksilberjodid ausfällt, wird man immer ein durch Stickstoff stark verunreinigtes Glykogen erhalten. Der Procentgehalt desselben an Stickstoff schwankt dann nach meiner Analyse zwischen 0,1 und 0,5. Das ist bei der sorgfältigsten Arbeit nicht zu vermeiden. Ein Grund dieses Uebelstandes liegt darin, dass die durch das Brücke'sche Reagens gefällte Substanz im Ueberschusse des Fällungsmittels etwas löslich ist.

Ohne Zweifel wusste Külz, dass bei einmaliger Fällung der Eiweissstoffe mit dem Brücke'schen Reagens nur ein unreines Präparat erhalten werde. Denn er schreibt wiederholte Reinigung vor, d. h. Wiederauflösung des zuerst gewonnenen Glykogenes in Wasser und abermaligen Zusatz von Salzsäure und Kaliumquecksilberjodid.

Ich habe durch vielfach wiederholte derartige Reinigung stickstofffreies Glykogen darzustellen gesucht. Es ist mir aber niemals gelungen. Allerdings erreichte ich es zuweilen, dass der Stickstoffgehalt unter 0,1 % herabging, immer aber beträchtlich über 0,01 % blieb. Ich habe darüber schon vor Austin's Arbeit berichtet¹⁾. Aus dem angegebenen Grunde ist also bei einer quantitativen Analyse des Glykogenes die wiederholte Reinigung durchaus nothwendig und auch von Külz vorgeschrieben worden. — Die wiederholte Reinigung ist aber mit wiederholten Filtrationen durch verschiedene Filter und mit vielen Auswaschungen nothwendig verknüpft, so dass Verluste unvermeidlich sind. Es ist desshalb nicht zu verwundern, dass selbst bei der sorgfältigsten, gewissenhaftesten, keine Mühe scheuenden Arbeit der erfahrenste Analytiker das Glykogen der Organe, ja, wie wir sahen, sogar einfach aufgelöstes Glykogen nicht vollständig gewinnen kann.

Wir haben gesehen, dass wenigstens mit den bisher angewandten Methoden trotz der Reinigung ein stickstofffreies Glykogen nicht zu erhalten ist. Nun könnte man auf den geringen Stickstoffgehalt kein so grosses Gewicht legen, wenn man sicher wüsste, dass es sich um Eiweiss handelt.

Um mir darüber einen Aufschluss zu verschaffen, habe ich ein bestimmtes Gewicht Glykogen, dessen Stickstoffgehalt ich bestimmt hatte, durch dreistündiges Erwärmen im siedenden Wasserbad mit

1) E. Pflüger, Dieses Archiv Bd. 66 S. 636.

2,2 %iger Salzsäure in Zucker übergeführt, dann die Flüssigkeit neutralisirt und mit $2\frac{1}{2}$ Volum Alkohol von 96 %o versetzt. Nach einiger Zeit schieden sich leichte Flocken aus, die ich abfiltrirte, trocknete und wog, um dann den Stickstoff zu bestimmen. Die Menge der Substanz war zu gering, um eine eingehendere Untersuchung anstellen zu können. Sicher aber ist, dass diese gefällte Substanz nur einen kleinen Theil des vorhandenen Stickstoffs enthielt, der zu 5 bis 6 %o in derselben enthalten war. Sollte also der Stickstoff des Glykogenes doch wesentlich durch Verunreinigung mit Eiweiss bedingt sein, so muss man annehmen, dass die Erhitzung mit 2,2 %iger Salzsäure das Eiweiss in Albumosen übergeführt hat, die durch den ziemlich starken Weingeist nicht mehr gefällt werden. Gleichwohl zeigt obiger von mir mehrmals mit gleichem Erfolg wiederholte Versuch, dass über den stickstoffhaltigen Körper, der das Glykogen verunreinigt, noch kein sicheres Urtheil abgegeben werden kann, also auch nicht über die Zahl, mit der der Stickstoffgehalt multiplicirt werden muss, um die Grösse der Verunreinigung zu bestimmen.

Wenn es also Austin gelungen wäre, mit seiner Verdauungsmethode stickstoffreies Glykogen darzustellen, so würde dies einen erfreulichen Fortschritt bezeichnen. Meine Prüfung der Angaben Austin's hat aber keine Bestätigung derselben ergeben, obwohl ich ganz genau so verfuhr, wie er es vorschreibt. Seine Vorschriften sind allerdings etwas knapp gefasst, sodass man oft nicht sicher ist, wie er eigentlich verfuhr.

So sagt er z. B. 1):

„In allen Fällen erwies sich das Glykogen trotz seiner Färbung als stickstofffrei, ausgenommen in dem einen Fall, in welchem die Fällung mit Brücke'schem Reagens unterlassen war. — — Es ist also klar, dass bei der Darstellung des Glykogenes aus der Verdauungsflüssigkeit das Brücke'sche Reagens nicht entbehrt werden kann.“ Aus dieser Darstellung scheint hervorzugehen, dass er bei jeder Analyse nur einmal mit Brücke'schem Reagens gefällt hat; da nun nach Külz und meiner Erfahrung dies nicht genügt, habe ich bei der Prüfung von Austin's Angaben angenommen, dass er die Anwendung des Brücke'schen Reagens im Sinne der von Külz gegebenen Vorschrift voraussetze.

1) Austin, Virchow's Archiv Bd. 150 S. 192.

Ich habe also das durch die Verdauungsmethode nach Austin gewonnene Glykogen nachträglich nicht bloss einmal, sondern zweimal wieder in Lösung gebracht und mit Brücke'schem Reagens und Salzsäure gereinigt.

Ich musste dies thun, weil ich fand, dass das durch die Methode Austin's gewonnene Glykogen durch eine einmalige Reinigung mit dem Brücke'schen Reagens noch beträchtliche Stickstoffmengen behalte, die erst durch eine zweite Reinigung wesentlich verringert werden. —

Dass Austin keinen Stickstoff in dem von ihm gewonnenen Glykogene auffinden konnte, lag, wie ich glaube, daran, dass er zu geringe Mengen von Substanz für die Analysen verwandte und dass seine Lösungen einen zu hoch gestellten Titer hatten, d. h. zu concentrirt waren.

Ich gebe im Folgenden einige analytischen Belege für die Wahrheit, dass das nach Austin dargestellte Glykogen keineswegs frei von Stickstoff ist.

Analyse I.

Stickstoffgehalt des durch Verdauung von Pferdeleber gewonnenen Glykogenes.

120 g bei 60° C. getrockneter Pferdeleber pulverisirt, mit 2 Liter Wasser im siedenden Bad 24 Stunden ausgezogen. — Nach Filtration wird der zehnte Theil des Rückstandes zu einem Verdauungsversuche nach Austin benutzt. 1 Flasche, enthaltend dieses Leberpulver in 1 Liter Salzsäure von 0,25 % + 0,5 g Pepsinum-Finzelberg absolutum Nr. 1, das aus der Fabrik direct bezogen worden war. Dauer der Verdauung 2½ Tage. Nach Neutralisation mit kohlen-saurem Natrium wurde auf 200 ccm eingedampft, nach Brücke-Külz nur **1 mal** gefällt, filtrirt mit 2 Vol. Alkohol 96 % gefällt.

Mit diesem Versuch wird gleichzeitig ein zweiter ebenso ausgeführt:

Erhalten aus beiden Versuchen im Ganzen 0,649 Glykogen. Das nach Kjeldahl daraus entbundene Ammoniak sättigte 1,7 ccm Schwefelsäure, von der 1 ccm = 2 mg N. Gefunden 3,4 mg N = 0,5 % Stickstoff.

Analyse II.

Stickstoffgehalt des Glykogenes, welches durch Verdauung aus Pferdeleber erhalten worden war.

10 g Leberpulver mit ½ Liter Wasser ½ Stunde ausgekocht. Dann wird nach Filtration der Flüssigkeit das ausgepresste Leberpulver 2½ Tage der Verdauung unterworfen in 1 Liter 0,25 % Salzsäure + 0,5 g Pepsinum-Finzelberg absolutum. Nach Abschluss der Verdauung wurde mit CO₃Na₂ neutralisirt, filtrirt, auf 200 ccm abgedampft, dann **2 mal** nach Brücke-Külz gereinigt; das erhaltene Glykogen ist bei 100° C. getrocknet worden. Darauf habe ich

nochmals das Glykogen in Wasser gelöst und im siedenden Wasserbad mehrere Stunden erhitzt, wodurch sich einige Flöckchen abschieden, von denen abfiltrirt wurde. Das abgekühlte Filtrat wird nochmals nach Brücke-Külz gereinigt, mit Alkohol gefällt u. s. w. und schliesslich erhalten bei 110° C. getrocknetes Glykogen = 0,7755 g mit einem N-Gehalt von 0,22 %. Die Stickstoff-Analyse ist von meinem Assistenten Herrn Dr. Schöndorff ausgeführt.

Analyse III und Analyse IV.

Stickstoffgehalt des Verdauungsglykogenes aus Kaninchenleber.

130 g Leber des Kaninchens frisch in Brei verwandelt, mit 600 ccm Wasser ½ Stunde gekocht, filtrirt, Leberbrei ausgepresst und in zwei Theile gesondert für zwei Versuche.

Finzelberg's Pepsin, wie es in den Apotheken vorkommt, mit Milchzucker verrieben aus der Flora-Apotheke in Poppelsdorf bezogen. 2 g für je einen Versuch gut ausgewaschen zur Entfernung des Zuckers und mit 1 Liter Salzsäure von 0,25 % die Verdauung 2½ Tage durchgeführt.

Der zweite Versuch wurde mit Pepsinum Finzelberg absolutum Nr. 1 angestellt. Ich nahm 0,5 g auf 1 Liter Salzsäure von 0,25 %, wusch aber dieses Pepsin, obwohl es ohne Zuckerzusatz war, auch gut mit Wasser aus, in dem es sehr schwer löslich ist.

Analyse III.

Dreimal wurde das Glykogen nach Brücke-Külz gereinigt.
Gefunden 1,0535 Glykogen mit 0,032 % Stickstoff.

Analyse IV.

Angewandt 0,8395 g Glykogen. Das daraus erhaltene Ammoniak sättigte 0,15 ccm Schwefelsäure = 0,3 mg Stickstoff. Das Glykogen enthält also 0,036 % Stickstoff.

Analyse V.

Stickstoffgehalt des durch Pepsinverdauung gewonnenen Leberglykogenes des Kaninchens.

Ungefähr 60 g ausgekochte frische Kaninchenleber in 1 Liter Verdauungssalzsäure von 0,25 % + 0,5 g Pepsinum absolutum. Nr. 1.

Nach 2½ Tagen Verdauung: Neutralisation. Vom starken Niederschlag abfiltrirt. Filtrat mit CO_3Na_2 alkalisch gemacht, auf 200 ccm eingedampft, mit Salzsäure neutralisirt und mit Kaliumquecksilberjodid und Salzsäure gefällt. Filtrat mit 2 Vol. Alkohol versetzt. — Nach einigen Tagen Flüssigkeit abgegossen, Sediment in Wasser gelöst, nochmals nach Brücke-Külz mit Salzsäure und Kaliumquecksilberjodid versetzt, filtrirt, und das Filtrat mit 2 Vol. Alkohol gefällt. Erhalten bei 100° C.:

2,6955 g Glykogen.

Hiervon verwandt zur Stickstoffanalyse nach Kjeldahl 0,698 g Glykogen.
Gefunden 0,1 % Stickstoff.

Analyse VI.

Stickstoffgehalt des Verdauungsglykogenes vom Kaninchen.

Während 20 Minuten ausgekochte 165 g frischer Kaninchenleber, gepresst, und mit 4 Liter 0,25 % Salzsäure bei 38 ° C. digerirt, unter Zusatz von Pepsin-Finzelberg's Präparat (aus der Flora-Apotheke in Poppelsdorf bezogen). Angewandt wurden 8 g Pepsin, die aber durch gründliches Auswaschen vom Zuckersatz befreit wurden.

Verdauung dauert 2½ Tag. Nach Abschluss der Verdauung durch Neutralisation Syntonin ausgefällt, Filtrat hiervon mit CO_3Na_2 schwach alkalisch gemacht und auf Wasserbad zu 1 Liter abgedampft. Zweimal wurde nach Brücke-Külz das Glykogen gereinigt. 2,960 g bei 118 ° C. getrocknetes Glykogen, nach Kjeldahl behandelt, liefern Ammoniak, das 0,85 ccm Schwefelsäure = 1,7 mg Stickstoff sättigt.

Das Glykogen enthält also: 0,06 % Stickstoff.

Analyse VII.

Stickstoffgehalt des Verdauungsglykogenes vom Kaninchen.

250 g Brei frischer Kaninchenleber wird ¼ Stunde in siedendes Wasser gebracht und gekocht. — Der abfiltrirte Brei in 4 Liter Salzsäure von 0,25 % gebracht und das Pepsin hinzugegeben. Dies war erhalten durch Auswaschen von 8 g mit Zucker verriebenen Pepsins, welches direct aus der Fabrik bezogen worden war.

Nach 3 tägiger Verdauung wird der geringe unverdaute Rest abfiltrirt; er mag etwa 20 g (feucht) betragen. Filtrat wird neutralisirt und vom Syntonin abermals filtrirt. Darauf wird das klare Filtrat mit Sodalösung schwach alkalisch gemacht und auf 1100 ccm eingedampft.

Zweimal nach Brücke-Külz gereinigt.

4,308 g bei 100 ° C. getrocknetes Glykogen liefern Ammoniak, das 0,72 ccm Schwefelsäure = 1,43 mg Stickstoff sättigt.

Also enthält das Glykogen: 0,03 % Stickstoff.

Ergebnisse.

I. Die Analyse des Glykogenes nach Austin liefert zu kleine Werthe. Dies ist von Austin bereits selbst durch Vergleichung seiner Methode mit der von Külz bewiesen. Denn die Methode Austin's liefert ungefähr dieselben Ergebnisse wie die von Külz. Ich habe aber gezeigt, dass die Methode von Külz zu niedrige Werthe liefert, die oft genug um sehr viele Procente von der Wahrheit abweichen.

E. Salkowsky rühmt in seinem soeben (1900) erschienenen „Praktikum der physiologischen und pathologischen Chemie“ von dem Verfahren Austin's:

„Es liefert sehr annähernd richtige Werthe.“

Diese Behauptung kann nicht mehr festgehalten werden.

2. Die Methode von Austin kann unter Umständen in Anwendung kommen, wo es sich nicht um absolute, sondern Vergleichswerthe handelt. Es müssen aber zwei Analysen, deren Vergleichung beabsichtigt ist, in genau derselben Weise durchgeführt werden. In erster Linie kommt hier in Betracht, dass gleiche Mengen desselben Pepsinpräparates auf gleiche Mengen des aufzuschliessenden Organbreies kommen.

Dies ist nur deshalb zulässig, weil in gewissen Fällen eine bessere Methode nicht bekannt ist, so dass die Austin'sche als Nothbehelf in Betracht kommt.

