

Eine neue Methode zur Darstellung und quantitativen Bestimmung des Glycogens in thierischen Organen.

Von

Dr. med. Herm. Ad. Landwehr.

(Der Redaction zugegangen am 15. Dezember 1883).

Von Methoden, die bisher für die Bestimmung des Glycogens vorgeschlagen sind, müssen genannt werden:

1. Die directe Wägungsmethode des nach Brücke dargestellten Glycogens.
2. Die indirekte Methode (Hydratation des Glycogens durch Mineralsäuren und Bestimmung des Traubenzuckers durch Titration oder durch den Saccharimeter).
3. Die colorimetrische Methode (Jodfärbung).
4. Die directe polarimetrische Bestimmung.

Die erste der oben angeführten Methoden ist die beste. Sie verlangt aber ein sehr sorgfältiges Arbeiten und hat ausserdem noch einige andere Uebelstände. So kostet sie bekanntlich auch viel Zeit und viel Geld. Böhm und Hoffmann¹⁾ beklagen schon ihre Langwierigkeit und Kostspieligkeit, und Külz²⁾ schliesst sich diesen Autoren an. Ausserdem hat sie aber auch Mängel in Betreff ihrer Genauigkeit. Die glycogenhaltige Flüssigkeit kommt unvermeidlich längere Zeit mit starker Salzsäure in Berührung; und durch mehrere Versuche konnte ich nachweisen, dass schon in der Kälte eine Zersetzung des Glycogens stattfindet. Die Zuckerbildung wächst

¹⁾ Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie, Bd. 3, S. 285.

²⁾ Archiv für die gesammte Physiologie, Bd. 24, S. 90.

mit der Concentration der Säure und der Dauer ihrer Einwirkung. Diese Thatsache ist auch schon von Kratschmer¹⁾ hervorgehoben worden. Zweitens wird aber die Brücke'sche Bestimmung dadurch ungenau, dass man die Flüssigkeit nicht vollständig mit Alkohol ausfällen darf, da sonst eine nicht unbedeutliche Menge fremder Substanzen mit niedergedrungen wird. Es ist deshalb schwer, die gesammte Glycogenmenge in reinem Zustande zu bekommen. So ist bei Gegenwart von Dextrin kaum eine annähernd genaue Trennung dieser beiden Substanzen möglich.

Was die zweite Methode, die der indirekten Bestimmung nach Saccharificirung des Glycogens anbetriift, so hat schon Kütz²⁾ ihre Schattenseite genügend hervorgehoben.

Ueber die dritte Methode (Vergleichung der Jodfärbung) brauche ich keine Worte zu verlieren, da sie allgemein als sehr ungenau gilt.

Die vierte von Kütz vorgeschlagene Methode scheidert an der starken Opalescenz des nach Brücke dargestellten Glycogens.

Es ist mir geglückt eine Methode zu finden, die eine genaue Bestimmung des Glycogens gestattet, selbst bei Gegenwart von Dextrin. Auch die Gegenwart von Traubenzucker, Milchzucker oder Inosit thut der Methode keinen Abbruch.

In Folgendem werde ich diese Methode kurz schildern und einige analytische Daten hinzufügen.

Glycogen giebt in gleicher Weise, wie thierisches Gummi, Achrooglycogen und Arabinsäure mit Eisenoxyd eine in Wasser vollständig unlösliche Verbindung, die zwar insofern nicht von constanter Zusammensetzung ist, als sich ein Ausfallen von freiem, später nicht abtrennbarem, Eisenoxydhydrat nicht vermeiden lässt. Diese Verbindung ist aber trotzdem zur genauen Bestimmung des Glycogens geeignet.

Mit Hilfe der Eisenoxydverbindung kann man aber auch besser als durch die bisher bekannten Methoden den ge-

¹⁾ Archiv für die gesammte Physiologie, Bd. 24, S. 148.

²⁾ Id., Bd. 24, S. 40.

samnten Glycogengehalt in reiner Form aus Organen und Flüssigkeiten gewinnen. Ich will zunächst die Methode der Darstellung beschreiben und dann die Modifikationen für die quantitative Bestimmung anschliessen.

Darstellung des Glycogens.

Die Gewinnung des Decocts geschieht in gewöhnlicher Weise mit bekannten Cautelen. Als besonders wichtig möchte ich jedoch hier noch hervorheben, grosse Sorgfalt auf mechanische Zerkleinerung der Organe zu verwenden. Hat man eine Leber bis zum Verschwinden der Jodreaktion ausgekocht und bringt den Brei dann noch einmal in die Reibschale, so liefert das Auskochen wieder nicht unbedeutende Glycogenmengen. Eine etwas grosse Wassermenge braucht man bei meinem Verfahren nicht zu fürchten, da sie für die Ausfällung des Glycogens nicht störend ist, also auch nicht durch Abdampfen entfernt zu werden braucht. Ein grosser Theil des Glycogens scheint in ähnlicher Weise im Protoplasma gebunden zu sein, wie das thierische Gummi im Mucin mit Globulinsubstanz. Alles was auf Globuline zerstörend und lösend einwirkt, erleichtert deshalb die vollständige Gewinnung sehr. Säuren und stärkere Alkalien sind aus bekannten Gründen zu vermeiden. Eine geringe Menge Natronlauge dem extrahirenden Wasser zugesetzt erleichtert, ohne merklich zu schaden, den Prozess jedoch sehr. Kochen bei erhöhtem Drucke (Papin'scher Topf) beschleunigt auch die Extraktion sehr.

Die vereinigten colirten Extrakte werden in einer Schale auf freiem Feuer zum Sieden erhitzt, mit einer kleinen Menge essigsäuren Zinks versetzt und bis zur vollständigen Coagulation des Eiweisses im Sieden erhalten. Enthält die Flüssigkeit freie Natronlauge, so ist diese vorher möglichst zu neutralisiren. Es kommt einzeln vor, dass das Eiweiss in Folge zu sauren Zinkacetats sich nicht gleich gut absetzt. In diesem Falle füge man vorsichtig zu der siedenden Flüssigkeit etwas kohlensaures Natron, und das Eiweiss wird sich in grossen Flocken abzuscheiden beginnen. Selbst der

in solchen Arbeiten Ungeübte erhält stets eine leicht filtrirende Flüssigkeit. Nach Absetzen des Niederschlags filtrirt man durch ein Faltenfilter und wäscht dasselbe mit heissem Wasser noch gut aus.

Das mit dem Waschwasser vereinigte Filtrat wird auf dem Wasserbade erhitzt und mit conc. Eisenchloridlösung versetzt. Die Glycogenmenge bedingt die zuzusetzende Menge des letzteren. Man bekommt bald Kenntniss des richtigen Masses. Hat man zu wenig zugesetzt, so kann später nachgeholfen werden, ein geringer Ueberschuss ist nicht zu vermeiden und schadet nicht.

Die dunkel-rothbraune Flüssigkeit wird jetzt unter Umrühren tropfenweise mit conc. Sodalösung versetzt, bis alles Eisen ausgefällt ist, wobei man Acht zu geben hat, dass man durch Ueberschäumen keinen Verlust erleidet. Zeigt eine abfiltrirte Portion der Flüssigkeit noch die geringste Opalescenz oder Jodreaktion, so muss weiter Eisenchlorid hinzugefügt werden, bis die Ausfällung des Glycogens eine vollständige ist. Selbst mehrere Liter Filtrat auf wenige Cubiccentimeter concentrirt, dürfen keine Jodreaktion geben. Der Niederschlag wird rasch auf's Filter gebracht und mit heissem Wasser ausgewaschen, so lange dieses noch etwas aufnimmt.

Jetzt bringt man den ausgewaschenen Rückstand in eine geräumige Schale, die zweckmässig auf Eis steht, setzt unter Zerreiben mit einem Pistill concentrirte Salzsäure nach und nach in kleinen Portionen zu, bis alles gelöst ist und giesst dann rasch die gelbliche Flüssigkeit in etwa die dreifache Menge 96% Alkohol. Das Glycogen fällt jetzt in schönen Flocken aus, kann bald abfiltrirt und durch Waschen mit Alkohol ganz von Säure und Eisenchlorid befreit werden. Selten ist noch ein Auflösen in wenig Wasser und nochmaliges Ausfällen mit Alkohol erforderlich.

Das eben geschilderte Verfahren habe ich später noch etwas modificirt. Das Auflösen des Eisenoxydniederschlags dauert nämlich immerhin einige Minuten, und während dieser Zeit ist das Glycogen der Einwirkung der starken Mineralsäure ausgesetzt. Um eine Zersetzung vollständig auszu-

schliessen, habe ich die Salzsäure deshalb durch eine organische Säure zu ersetzen gesucht. Als besonders geeignet zeigte sich Weinsäure oder Essigsäure. Um diese Säuren anzuwenden, bringt man die Glycogeneisenoxydverbindung auf ein Wasserbad und setzt entweder conc. Essigsäure oder nach vorherigem geringen Wasserzusatz pulverisirte Weinsäure so lange zu bis alles gelöst ist. Ein Kochen ist zu vermeiden, weil sowohl die betreffenden organischen Eisensalze dadurch zersetzt werden würden, als auch nach angestellten Versuchen die Einwirkung organischer Säuren auf Glycogen keineswegs so indifferent ist als man gewöhnlich annimmt. Die in beiden Fällen rothbraune Flüssigkeit wird gut abgekühlt, rasch mit conc. Salzsäure versetzt, bis die Farbe gelb geworden ist und sofort in Alkohol gegossen. Eisenchlorid und Weinsäure, resp. Essigsäure gehen in den Alkohol, das Glycogen fällt aus. Hat man bei der Ausfällung des Eiweisses zu viel essigsäures Zink angewendet und ist ein Theil davon durch die Soda als Zinkcarbonat in den Niederschlag der Glycogenverbindung gekommen, so geht dieses als Chlorzink auch in den Alkohol. Aus diesem Grunde ziehe ich das essigsäure Zink dem Bleiacetat zur Ausfällung des Eiweisses vor. Abeles hat Chlorzink zum Ausfällen des Eiweisses benutzt, siehe Hoppe-Seyler's Handbuch, 5. Aufl., S. 132.

Das so gewonnene Glycogen ist schon nach der ersten Fällung stickstoff- und aschefrei, erhält bei schlechtem Auswaschen höchstens Spuren von Eisenchlorid, die ein nochmaliges Auflösen und Ausfällen nöthig machen können.

Am Schlusse der Darstellung meiner Methode mache ich nochmals darauf aufmerksam, dass es für einen glatten Gang der Gewinnung von Wichtigkeit ist, den Glycogeneisenoxydniederschlag weder zu lang auszukochen, noch überhaupt zu lange (Stunden oder Tage lang) unzersetzt liegen zu lassen. Am besten ist es, den Niederschlag sofort abzufiltriren, gleich mit heissem Wasser auszuwaschen und dann sofort zu zerlegen. Die Gründe für das eben Gesagte erhellen

aus den zu den quantitativen Glycogenbestimmungen weiter unten zu machenden Bemerkungen.

Setzt man grossen Mengen Blut oder Eiter, die frei von Glycogen sind, Spuren von Glycogen zu, so gelingt es mit dieser Methode sie wiederzugewinnen, so dass sie deutlich durch Jod erkannt werden können.

Ehe ich mich jetzt zur Schilderung der quantitativen Methode wende, bemerke ich, dass Dextrin oder Traubenzucker, wenn sie anwesend sind, sich im Filtrat und Waschwasser von der Glycogeneisenverbindung befinden, worin sie nach bekannten Methoden leicht bestimmt werden können. Diese Flüssigkeit enthält von zugesetzten Reagentien nur etwas Soda.

Das nach der eben geschilderten Methode gewonnene Glycogen stellt nach Waschen mit absolutem Alkohol, im Vacuum getrocknet, ein rein weisses Pulver dar, dessen Lösung gegen Kupferoxyd, Jod oder verdünnte Säuren sich wie anderes Glycogen verhält, aber eine viel geringere Opaleszenz zeigt als das nach Brücke's Methode dargestellte Glycogen. Die optische Drehung einer Lösung von 4,23% Glycogen konnte im 200 cm. langen Rohr noch bestimmt werden. Aus einer einmaligen Bestimmung von Hundeleberglycogen ergab sich:

$$(\alpha)_D = + 213,3^\circ \text{ (bei } 18^\circ \text{ C.)}$$

Quantitative Bestimmung.

Die Glycogeneisenverbindung kann in dreierlei Weise zur quantitativen Bestimmung benutzt werden.

1. Durch Wägung des rein dargestellten Glycogens;
2. Durch polarimetrische Bestimmung des wieder aufgelösten Glycogens;
3. Durch Benutzung der Eisenoxydverbindung selbst.

1. Die erste Methode giebt vorzügliche Resultate, wie die angefügten Analysen zeigen. Es ist jedoch nöthig, dass die zuletzt erhaltene saure Flüssigkeit vollständig durch Alkohol ausgefällt wird, der Niederschlag nach sorgfältigem Waschen mit absolutem Alkohol erst im Vacuum über Schwefel-

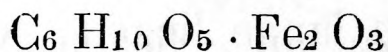
säure getrocknet, dann bei 100° und schliesslich bei 120° bis zum constanten Gewicht gehalten wird. Von einem Leberextrakt, aus dem das Eiweiss mittels Zinkacetat entfernt wurde, wurden 100 cc., 70 cc. und 30 cc. abgemessen und in diesen Portionen das Glycogen bestimmt:

100 cc. gaben . . .	0,616
30 « « . . .	0,182
(Berechnet	0,1848)
70 cc. gaben . . .	0,430
(Berechnet	0,4312).

2. Polarimetrische Bestimmungen habe ich nicht ausgeführt.

3. Man sollte meinen, dass die dritte Methode die vorzüglichsten Resultate geben müsste, da man sich leicht überzeugen kann, dass das Glycogen vollständig in den Niederschlag geht und alle etwa mechanisch mitgerissenen Substanzen leicht ausgewaschen werden können. Ausserdem kommt das Glycogen weder mit Säuren noch mit einem anderen zersetzenden Agens in Berührung. Aus gleich zu nennenden Gründen bleibt diese Bestimmung jedoch hinter der ersten zurück; ihre leichtere und bedeutend schnellere Ausführung wird sie aber wahrscheinlich für viele Bestimmungen, zumal für solche, wo es besonders auf gute relative Werthe ankommt, beliebt machen.

Das Glycogen fällt wahrscheinlich in der Verbindung:



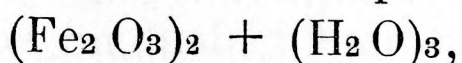
aus. Diese Formel verlangt: 40,4% $\text{Fe}_2 \text{O}_3$. Thatsächlich erhält man jedoch immer mehr Eisenoxydhydrat als diese Formel verlangt, selbst wenn man noch unausgefälltes Glycogen in der Flüssigkeit hat. Im Niederschlage befindet sich immer freies Eisenoxydhydrat. Selbst aber wenn die Zusammensetzung auch constant wäre, so liesse sich aus dem Gewicht des erhaltenen Niederschlages nicht einfach das Glycogen berechnen, da man ein Mitausfallen von etwas freiem Eisenoxydhydrat doch nicht würde vermeiden können, da man ja jedenfalls alles Glycogen ausfällen will.

Man könnte nun denken, das Glycogen sei in der Gewichts-differenz des bei 120° getrockneten Niederschlages

und der Asche (Eisenoxyd) gegeben. Annähernde Werthe bekommt man allerdings auf diese Weise; dass sie nicht ganz genau sind, liegt daran, dass das Eisenoxydhydrat sein Wasser bei 120° noch nicht vollständig abgibt. Es hält aber auch keine ganz constante Menge gebunden, die eine genaue Berechnung zuliesse. Bemerket sei jedoch schon hier, dass nach mehreren Bestimmungen das Eisenoxydhydrat nach anhaltendem Auswaschen mit heissem Wasser und ein- bis zweistündigem Trocknen zwischen 110 — 120° noch etwa 8% Wasser gebunden hält.

Es war für meinen Zweck wichtig, über das Verhalten des Hydratwassers im Eisenoxydhydrat etwas Genaueres zu wissen, als die chemischen Handbücher angeben. Ich hielt es deshalb für nöthig, durch einige Versuche mir über diese Frage Auskunft zu verschaffen.

Fällt man eine heisse Lösung von Eisenchlorid mit Soda, wäscht den Niederschlag aus und trocknet ihn über Schwefelsäure im Vacuum, so erhält man ein Eisenoxydhydrat mit 14 — 15% H_2O . Es entspricht der Formel:

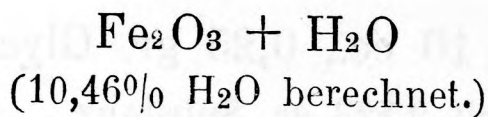


die $14,4\%$ H_2O verlangt. Dieses getrocknete Eisenoxydhydrat löst sich erst in der Wärme schnell in Weinsäure oder Essigsäure, jedoch noch gut in kalter Salzsäure. Trocknet man jedoch das Eisenoxydhydrat nicht und lässt man es vor dem Auflösen nicht zu lange liegen, so löst es sich auch in kalter Weinsäure oder Essigsäure bald. Aus diesem Verhalten schliesse ich, dass zunächst ein Eisenoxydhydrat von der Formel:

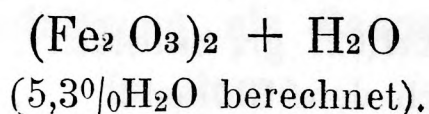


ausfällt, welches später in das Hydrat von geringerem Wassergehalt übergeht.

Kocht man jedoch den mit Soda in Eisenchloridlösung erhaltenen Niederschlag vor dem Trocknen im Vacuum erst einige Zeit, wobei sein Volumen geringer wird, oder trocknet den gleich abfiltrirten Niederschlag bei 90 — 100° , so erhält man ein Hydrat, das beim Glühen nur ca. 10% H_2O abgibt. Es entspricht der Formel;



Steigert man die Temperatur, so wird langsam weiter Wasser abgegeben, bis das Gewicht bei 5,5 – 6% H₂O constant wird. Man hat jetzt das Hydrat:



welches eine schwarze Masse bildet. Beim Zerreiben wird dieselbe zu einem dunkel-ziegelrothen Pulver, das auch in Mineralsäuren nur langsam löslich ist.

Das letzte Hydratwasser sitzt sehr fest und beginnt erst gegen 200° C. langsam zu entweichen. Erst beim Glühen erhält man sofort wasserfreies Eisenoxyd.

Für die quantitative Bestimmung durch Veraschen haben wir wenig dem bei der Darstellungsmethode Gesagten zuzufügen. Es ist nöthig ausser dem Zinksalz gleich anfangs auch etwas Chlorbarium dem siedenden Organauszug zuzusetzen, um die Phosphorsäure zu entfernen, die sonst den Eisenniederschlag verunreinigen würde. Der Ueberschuss von Zink und Baryt wird durch etwas Soda vor dem Eisenzusatz entfernt.

Das Veraschen nimmt man im Porzellantiegel vor. Die Verbindung wird vor dem Veraschen mit conc. Salpetersäure angefeuchtet, getrocknet und geglüht. Nach dem Abkühlen noch einmal mit derselben Säure angefeuchtet, geglüht und gewogen.

Was meine Versuche mit dieser Methode betrifft, so habe ich zunächst eine 2,5%ige Glycogenlösung angefertigt und in verschiedenen Portionen davon Bestimmungen gemacht. Absichtlich habe ich sehr verschiedene Eisenchloridmengen den Einzelportionen zugesetzt, um experimentell den Einfluss festzustellen:

Versuch 1. 20 cc., 0,5 gr. Glycogen enthaltend.

Tiegel mit 1,344 gr. Substanz . . . 21,248

Tiegel nach dem Glühen . . . 20,742

0,506

Versuch 2. 10 cc., 0,25 gr. Glycogen enthaltend.

Tiegel mit 9,523 gr. Substanz . . .	20,431
Tiegel nach dem Glühen . . .	20,190
	<u>0,241</u>

Versuch 3. 10 cc., 0,25 gr. Glycogen enthaltend.

Tiegel mit 1,027 gr. Substanz . . .	20,931
Tiegel nach dem Glühen . . .	20,678
	<u>0,253</u>

Versuch 4. 10 cc., 0,25 gr. Glycogen enthaltend.

Tiegel mit 0,705 gr. Substanz . . .	21,382
Tiegel nach dem Glühen . . .	21,133
	<u>0,249</u>

Dann habe ich ein Kaninchenleberdecoct gemacht, mit Zinkacetat enteiwesst, und die einzelnen Portionen mit nicht abgemessenen Eisenchloridmengen ausgefällt und durch Subtraktion der Asche von der bei 120° getrockneten Verbindung folgende Werthe für gleiche Portionen erhalten:

1. 0,356
2. 0,349
3. 0,353
4. 0,347
5. 0,350

Viel besser übereinstimmende Werthe bekommt man jedoch, wenn man aus einer Bürette zu gleichen Portionen gleiche genügende Cubiccentimeter Eisenchloridlösung laufen lässt. Die Differenz überschreitet in diesem Falle nicht 5 mgr.

Für grössere Versuchsreihen, wo es nicht so sehr auf ganz absolute Werthe, als auf schnelle und leichte Bestimmung ankommt, wird diese Methode mit abgemessenen gleichen Eisenchloridmengen jeder anderen vorzuziehen sein.

Schliesslich sei noch bemerkt, dass alles für die Bestimmung des Glycogens Gesagte auch für die Bestimmung des thierischen Gummis und der Arabinsäure gilt.

Strassburg i. E., Physiologisch-chemisches Institut.