

Aus dem Institut für luftfahrtmedizinische Pathologie des RLM am Pathologischen Institut der Universität Freiburg/Br. Leiter: Prof. Dr. F. Büchner

## Molekulargewichtsbestimmung an Glykogenen durch Anwendung des Rayleighschen Gesetzes

Von Hj. Staudinger und I. Haenel-Immendörfer

Mit 2 Abbildungen

(Eingegangen am 16. September 1943)

Wie die Konstitutionsaufklärung ergab, gehört Glykogen zu der Gruppe der sphäromakromolekularen Stoffe.<sup>1)</sup> Glykogenlösungen sind kolloide Sole, bei denen das einzelne Kolloidteilchen identisch mit dem Makromolekül ist; dieses hat kugelförmige Gestalt. Wie bei Cellulose und Stärke existiert eine polymerhomologe Reihe, d. h. es gibt Glykogene ganz verschiedenen Molekulargewichts.<sup>1)</sup>

Bei der großen biologischen Bedeutung, die dem Glykogen zukommt, schien es uns wichtig, natürliche Glykogene verschiedener Herkunft zu untersuchen und die Frage zu prüfen, ob sie sich hinsichtlich ihrer Zusammensetzung und Molekülgröße charakteristisch unterscheiden. Dazu sind Methoden erforderlich, die es gestatten, das Molekulargewicht von Glykogenen mit kleinen Substanzmengen schnell und in allen vorkommenden Größenordnungen hinreichend genau zu bestimmen.

### I. Möglichkeiten zur Molekulargewichtsbestimmung an Glykogenen.

1. Die osmotische Methode:<sup>2)</sup> Sie hat den Vorteil, daß sie ohne Kenntnis irgendeiner Stoffkonstanten direkt das Mol.-Gewicht in einfacher Weise zu bestimmen gestattet. Die Methode ist jedoch nur bis zu einem maximalen Mol.-Gewicht von  $2-3 \cdot 10^6$  anzuwenden, da die osmotischen Drucke dann zu klein werden, um sich genau bestimmen zu lassen. Außerdem benötigt man bei den hohen Mol.-Gewichten entsprechend große Substanzmengen.

2. Mol.-Gewichtsbestimmung durch Fällungstiteration nach G. V. Schulz: Diese wurde von E. Husemann für Glykogene ausgearbeitet.<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup> H. Staudinger u. E. Husemann, Liebigs Ann. Chem. 530, 1 (1937).

<sup>2)</sup> Eine zusammenfassende Übersicht über die osmotische Molekulargewichtsbestimmung findet man bei G. V. Schulz, Fortschritte der Chemie, Physik und Technik der makromolekularen Stoffe, München 1942, S. 49.

<sup>3)</sup> E. Husemann, J. prakt. Chem. [2], 158, 163 (1941).

Die Methode erlaubt ein Arbeiten mit geringen Substanzmengen, doch ist sie nur bis zu einem maximalen Mol.-Gewicht von  $5 \cdot 10^5$  mit einiger Genauigkeit anwendbar.

3. Die Teilchengewichtsbestimmung mit der Ultrazentrifuge nach Th. Svedberg: Für Glykogen wurde diese in weitesten Grenzen gültige Methode noch nicht angewandt. Da uns keine Ultrazentrifuge zur Verfügung steht, kommt diese Methode für uns nicht in Betracht.

4. Die Teilchengrößenbestimmung durch Messung der Diffusions- bzw. Dialysiergeschwindigkeit: Versuche darüber sind bei uns im Gange.

5. Eine ungefähre Abschätzung des Mol.-Gewichtes von sehr hochmolekularen Glykogenen ist E. Husemann und H. Ruska<sup>4)</sup> durch direkte Sichtbarmachung und Ausmessung der Glykogenmoleküle im Elektronenübermikroskop geglückt. Doch ist diese Methode für unsere Fragestellung zu ungenau.

6. Die Teilchengrößenbestimmung durch Anwendung des Rayleighschen Gesetzes: Sie beruht auf der quantitativen Bestimmung des Tyndallichtes kolloider Lösungen. Schon eine grob qualitative Betrachtung von Lösungen verschieden hochmolekularer Glykogene zeigt einen deutlichen Unterschied ihrer Opaleszenz, so daß uns dieser Weg zu Mol.-Gewichtsbestimmungen an Glykogenen aussichtsreich erschien. Darüber soll im folgenden berichtet werden.

## II. Über das Rayleighsche Gesetz.

Das Rayleighsche Gesetz läßt sich durch folgende Gleichung ausdrücken:<sup>5)</sup>

$$(1) \quad I_0 = I \frac{24\pi^3 v^2 \nu n^4}{\lambda^4} \left( \frac{n_1^2 - n^2}{n_1^2 + 2n^2} \right)^2$$

$I_0$  = Intensität des gesamten gestreuten Lichtes;  $I$  = Intensität des einfallenden Lichtes;  $v$  = Volumen des Teilchens;  $\nu$  = Anzahl der Teilchen in Lösung;  $n_1$  = Brechungsindex des Teilchens in Lösung;  $n$  = Brechungsindex des Lösungsmittels;  $\lambda$  = Wellenlänge des Lichtes im Vakuum.

Danach ist das gestreute Licht proportional der Anzahl der Teilchen in Lösung, dem Quadrat des Teilchenvolumens und umgekehrt proportional der 4. Potenz der Wellenlänge. Diese Beziehung wurde wiederholt, jedoch fast ausschließlich an Dispersoidkolloiden vor allem anorga-

<sup>4)</sup> E. Husemann u. H. Ruska, J. prakt. Chem. [2], **156**, 1 (1940); Naturw. **28**, 534 (1940).

<sup>5)</sup> J. W. Strutt, Phil. Mag. [4], **41**, 107, 274, 447 (1871); [5], **12**, 81 (1881); **47**, 375 (1899); vgl. auch H. Freundlich, Kapillarchemie 4. Aufl., Leipzig 1932, 2. Bd., S. 20.

nischer Natur, geprüft und hinsichtlich der Proportionalität der drei genannten Variablen für gültig gefunden.<sup>6)</sup> P. Putzeys und J. Brosteaux haben das Gesetz auch zur Teilchengrößenbestimmung an Proteinlösungen angewendet.<sup>7)</sup> Die Rayleighsche Gleichung gilt nur für Teilchen, die klein gegen die Wellenlänge  $\lambda$  sind, also etwa bis zu einem Durchmesser von mindestens  $100 \mu\mu$ .<sup>8)</sup>

Die Trübung kann durch Messung des seitlich ausgestrahlten Tyndallichtes oder der Schwächung des eingestrahnten Lichtes, also durch Bestimmung der Extinktion, quantitativ erfaßt werden. Unter der Voraussetzung, daß die Lichtschwächung im wesentlichen nur durch die Lichtstreuung erfolgt, sind beide proportional.<sup>9)</sup> Die Trübungsmessung an Glykogenlösungen durch Bestimmung der Extinktion wurde von uns mit dem Zeisschen Stufenphotometer versucht. Doch sind die Resultate schlecht reproduzierbar. Weder die Gültigkeit des Lambert-Beerschen Gesetzes, also die lineare Proportionalität der Extinktion und der Konzentration, noch eine klare Abhängigkeit der Extinktion vom Molekulargewicht, konnte in eindeutiger Weise aus diesen Messungen entnommen werden. Auch ist der Substanzaufwand nicht unbeträchtlich, da man mit relativ konz. Lösungen arbeiten muß.

Zur Trübungsmessung durch Bestimmung des Streulichtes verwendeten wir den Zeisschen Stufenphotometer mit dem Zeisschen Nephelometervorsatz. Hierbei wird die Trübung einer Lösung mit einer Milchglasscheibe verglichen. Die so erhaltenen Werte sind relative Trübungswerte ( $Tr_{rel.}$ ), die für jeden Apparat verschieden sind. Um sie auf ein absolutes Maß zu bringen, werden sie mit der Trübung eines mitgelieferten Trübglaskörpers verglichen, dessen absoluter Trübwert bekannt ist. Unter der absoluten Trübung ( $Tr_{abs.}$ ) versteht man das Verhältnis der gestreuten zur gesamt eingestrahnten Lichtmenge:

$$(2) \quad Tr_{abs.} = J/J_0.$$

Dabei sind bei der verwendeten Anordnung folgende Voraussetzungen gemacht: Die Beobachtung erfolgt unter  $45^\circ$  zum einfallenden

<sup>6)</sup> H. Bechhold u. F. Hebler, Kolloid-Z. **31**, 70 (1922); H. Kleinmann, Biochem. Z. **99**, 115 (1919); W. Mecklenburg, Kolloid-Z. **14**, 172 (1914); **15**, 149 (1915); **16**, 97 (1915); G. Mie, Ann. Physik. **25**, 377 (1908); A. W. Owe, Kolloid-Z. **32**, 73 (1923); W. Streubing, Ann. Physik **26**, 329 (1908); T. Teorell, Kolloid-Z. **53**, 322 (1930); **54**, 58, 150 (1931); vgl. auch F. V. v. Hahn, Dispersoidanalyse, Dresden 1928; Wo. Ostwald, Licht und Farbe in Kolloiden, Dresden 1924.

<sup>7)</sup> P. Putzeys u. J. Brosteaux, Trans. Farad. Soc. **31**, 1314 (1935); Letteren Schoone Kunsten Belgie, Kl. Wetensch. **3**, 3 (1941). Nachtrag bei der Korrektur: Th. Bücher hat das das Rayleighsche Gesetz mit Erfolg in der Fermentchemie angewendet. Vergl. den Vortrag anlässlich der Vortragsveranstaltung des VdCh in München am 15. u. 16. Oktober 1943.

<sup>8)</sup> A. W. Owe, Kolloid-Z. **32**, 73 (1923); W. Mecklenburg, Kolloid-Z. **16**, 97 (1915); F. V. v. Hahn, Dispersoidanalyse, Dresden 1928, S. 94.

<sup>9)</sup> T. Teorell, Kolloid-Z. **54**, 150 (1931).

Lichtstrahl; die durchstrahlte Schicht ist 1 cm tief.<sup>10)</sup> Außerdem ist die absolute Trübung von der Wellenlänge abhängig, es muß also mitgegeben werden, mit welchem Filter (*L*-Filter 1—3 von Zeiss) gemessen wurde. Da bei der Untersuchung eines Stoffes die Brechungsexponenten konstant sind, kann man die Rayleighsche Gleichung (1) mit Gleichung (2) auch einfacher schreiben:

$$(3) \quad Tr_{\text{abs.}} = k \frac{v^2 \cdot v}{\lambda^4}.$$

Da die Anzahl der Teilchen  $v$  in Gleichung (3)

$$v = \frac{c}{v \cdot \rho}$$

$c$  = Konzentration in %,  $\rho$  = Dichte des Teilchens, ist

$$(4) \quad Tr_{\text{abs.}} = k \frac{c \cdot v}{\lambda^4 \cdot \rho}.$$

Das Molekulargewicht eines Glykogenmoleküls ist ferner proportional seinem Volumen. Da die Dichte auch in die Konstante einzubeziehen ist, können wir auch schreiben:

$$(5) \quad \frac{Tr_{\text{abs.}}}{c} = k \cdot \frac{M}{\lambda^4}.$$

Die absolute Trübung einer Lösung, die 1 g Substanz im Liter enthält, schlagen wir vor, spezifische Trübung ( $Tr_{\text{spez.}}$ ) zu nennen. Die Wellenlänge  $\lambda$  kann man in die Konstante einbeziehen. So ergibt sich, die Gültigkeit des Rayleighschen Gesetzes für Glykogen vorausgesetzt, folgende einfache Beziehung:

$$(6) \quad Tr_{\text{spez.}} = K_L \cdot M.$$

Die Konstante  $K$  mit dem Index der Wellenlänge bzw. des verwendeten Filters ist also der Proportionalitätsfaktor zwischen der Trübung einer Glykogenlösung von der Konzentration 1 g/Liter und dem Mol.-Gewicht. Die Konstante  $K_L$  direkt aus dem Rayleighschen Gesetz (1) zu ermitteln, wäre von großer Bedeutung, da man so eine von anderen Methoden unabhängige Möglichkeit zur Mol.-Gewichtsbestimmung in der Hand hätte. Doch ist das nur ungefähr möglich, da der Brechungsexponent des Glykogens nicht exakt zugänglich ist; auch das wirksame Volumen eines Glykogenmoleküls ist wegen der unbekanntenen Größe der Solvation nicht genau aus seinem Molekulargewicht zu errechnen. Deshalb prüften wir die Gültigkeit des Rayleighschen Gesetzes mit Glykogenen bekannten Molekulargewichts und bestimmten so die Konstante  $K_L$  empirisch.

<sup>10)</sup> Vgl. die Gebrauchsanweisung von Zeiss „Mess 430 1“.

## III. Über die Gültigkeit des Rayleighschen Gesetzes bei Glykogenen.

Es standen uns sechs Glykogene mit verschiedenem Mol.-Gewicht ( $M$ ) zur Verfügung. Drei davon verdanken wir dem Entgegenkommen von Erl. Doz. Dr. E. Husemann. Das Mol.-Gewicht von diesen ist zu  $1,8 \cdot 10^6$ ,  $1,4 \cdot 10^6$ ,  $0,45 \cdot 10^6$  bestimmt worden.<sup>11)</sup> Weitere drei Glykogensorten haben wir aus Meerschweinchenlebern nach dem von uns veröffentlichten Verfahren dargestellt<sup>12)</sup> und durch fraktioniertes Ausfällen mit Methanol in Produkte mit verschiedenem Mol.-Gewicht aufgeteilt. Von den so gewonnenen Präparaten wurde das Mol.-Gewicht mit den von G. V. Schulz angegebenen Zellen<sup>13)</sup> osmotisch in  $1n$ -CaCl<sub>2</sub>-Lösung bei 27° bestimmt (vgl. Tab. 1). Alle angegebenen Mol.-Gewichte sind Durch-

Tabelle 1.

Osmotische Molekulargewichtsbestimmungen an Glykogenen in  $1n$ -Chlorcalciumlösung bei 27° C.

Fraktion	$c$ in g/Liter <sup>14)</sup>	$p \cdot 10^3$	$p/c \cdot 10^4$	$M$
III	41,8	0,46	0,110	2 200 000
	41,7	0,45	0,107	
	38,7	0,42	0,109	
	22,5	0,24	0,107	
	17,4	0,19	0,109	
	17,3	0,20	0,115	
	16,7	0,18	0,108	
	16,1	0,18	0,112	
	8,0	0,09	0,113	
	8,0	0,09	0,113	
IV	81,4	1,27	Mittel 0,110	1 700 000
	27,2	0,37	0,156	
	24,6	0,33	0,136	
	18,8	0,23	0,134	
	18,2	0,27	0,149	
	18,2	0,27	0,148	
	8,3	0,12	0,145	
V	16,8	0,59	Mittel 0,145	700 000
	8,4	0,29	0,351	
	8,1	0,29	0,345	
	5,4	0,18	0,358	
	4,3	0,15	0,333	
	4,3	0,15	0,349	
	3,6	0,13	0,361	
		Mittel 0,350		

<sup>11)</sup> Für die freundliche Überlassung der Präparate möchten wir auch an dieser Stelle bestens danken.

<sup>12)</sup> Hj. Staudinger, Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem. **275**, 122 (1942). ✕

<sup>13)</sup> G. V. Schulz, Z. physik. Chem. (A) **176**, 317 (1936).

<sup>14)</sup> Die Konzentration wurde polarimetrisch bestimmt  $[\alpha]_D = 196,5^\circ$ , vgl. Z. Gatin Gruzewska, Pflügers Arch. **102**, 569 (1904).

schnittswerte, da auch die fraktionierten Glykogene noch polymolekular sind. Wie man aus Tab. 1 ersieht, gehorchen selbst die höchstmolekularen Glykogene dem van't Hoff'schen Gesetz.

$$M = \frac{R \cdot T \cdot c}{p}$$

$R$  = Gaskonstante,  $p$  = osmot. Druck in Atm.,  $c$  = Konzentration in g/Liter,  $T$  = absolute Temperatur.

Die Daten zur Berechnung der absoluten Trübung aus der gemessenen relativen Trübung nach der Gleichung:<sup>15)</sup>

$$Tr_{\text{abs.}} = \frac{Tr_{\text{rel.}}}{H} \cdot d \cdot t$$

$H$  = relat. Trübung des Trübungskörpers,  $t$  = absol. Trübung des Trübligkörpers,  $d$  = Gefäßfaktor; finden sich in Tab. 2.

Tabelle 2.

Werte für die verwendeten Filter und den Trübligkörper zur Berechnung der absoluten Trübung.

Durchlässigkeitsmaximum des Filters $L_1$ .....	$\lambda = 615 \mu\mu^{16)}$
Durchlässigkeitsmaximum des Filters $L_2$ .....	$\lambda = 533 \mu\mu^{16)}$
Relativer Trübwert $H$ des Trübligkörpers (gegen Vergleichsscheibe 3):	
für Filter $L_1 = 18,4$ ,	für Filter $L_2 = 38,1$ .
Absoluter Trübwert $t$ des Trübligkörpers: <sup>16)</sup>	
für Filter $L_1 = 0,00229$ ,	für Filter $L_2 = 0,00465$ .

Der Gefäßfaktor  $d$  ist hier = 1, da wir alle Messungen mit Keillichtbeleuchtung im Reagenzglas ausführten. Da die Filter nicht monochromatisch sind, bedeuten die angegebenen Wellenlängen für die verwendeten Filter  $L_1$  und  $L_2$  Filterschwerpunkte. Alle Messungen der relativen Trübungen wurden gegen die Vergleichsscheibe 3 durchgeführt. Die Abhängigkeit der spezifischen Trübung von der Temperatur und von der Reagenzglasweite sind aus der Tab. 3 zu ersehen.

Danach ist die Trübung einer Glykogenlösung nur in sehr geringem Maße von der Temperatur abhängig. Da sich im Versuchsgefäß durch die Erwärmung der Beleuchtungsbirne sehr bald eine Temperatur von 35° bis 40° einstellt, wurden alle Messungen bei dieser Temperatur durchgeführt. Auch die Reagenzglasbeschaffenheit hat einen geringen Einfluß auf die spez. Trübung. Wir wählten für alle folgenden Messungen das

<sup>15)</sup> Gebrauchsanweisung von Zeiss „Mess 430 1“.

<sup>16)</sup> Die Werte verdanken wir der freundlichen Mitteilung der Firma C. Zeiss, Jena.

<sup>17)</sup> T. Teorell, Kolloid-Z. 54. 150 (1931).

Tabelle 3.

Abhängigkeit der spezifischen Trübung von Glykogen von der Temperatur und von der zur Messung benutzten Reagenzglasweite.  $M = 1,7 \cdot 10^6$ .

$c$ g/Liter	Temp.	Reagenzglasweite in mm	$Tr_{rel.}$	$Tr_{abs.} \cdot 10^4$	$Tr_{spez.} \cdot 10^4$
3,2	10°	11 (rel. dickwand.)	46,0	57,5	18,0
	40°	11	44,5	55,6	17,4
	75°	11	44,0	55,0	17,2
	40°	14 (gew. Reagenzgl.)	43,0	53,8	16,8

Tabelle 4.

Abhängigkeit der spez. Trübung von Glykogen ( $M = 1,7 \cdot 10^6$ ) von der Magnesiumchloridkonzentration des Lösungsmittels.

$c$ ( $MgCl_2$ ) <sup>18)</sup> %	$c$ (Glykogen) g/Liter	$Tr_{rel.}$	$Tr_{abs.} \cdot 10^4$ ( $L_1$ )	$Tr_{spez.} \cdot 10^4$ ( $L_1$ )
0,0	2,1	48,9	61,1	29,1
	1,8	40,1	50,1	27,9
0,5	3,0	60,2	75,1	25,0
	2,2	47,1	58,9	26,8
1,0	2,4	44,7	55,8	23,2
	2,0	38,7	48,4	24,2
2,0	2,5	43,8	54,8	21,9
	1,7	32,4	40,5	23,8
5,0	1,2	19,8	24,8	20,6
	0,95	15,8	19,8	20,8
7,5	2,9	43,8	54,8	18,9
	1,0	15,4	19,2	19,2
10,0	1,6	22,7	28,4	17,8
	1,2	17,6	22,0	18,3
15,0	3,2	44,5	55,6	17,4
	1,3	18,1	22,6	17,4
20,0	2,8	41,7	52,2	18,6
	1,6	21,8	27,2	17,0

etwas dickwandige Glas von 11 mm Durchmesser, welches die Messung mit nur 3 ccm Lösung gestattet.

Wie wir im Verlauf der Untersuchung fanden, ist die Trübung einer Glykogenlösung sehr stark von der Wahl des Lösungsmittels abhängig. Am geeignetsten fanden wir eine wäßrige Magnesiumchloridlösung. Die Abhängigkeit der spez. Trübung vom Magnesiumchloridgehalt der Lösung zeigt Tab. 4 und Abb. 1.

Wie man sieht, sinkt die spez. Trübung rasch mit steigendem Magnesiumchloridgehalt bis zu einen Gehalt von 10%  $MgCl_2$ , um dann annä-

<sup>18)</sup> Der Magnesiumchloridgehalt des käuflichen Magnesiumchlorids p. a. wurde bestimmt. Die Zahlen beziehen sich auf wasserfreies  $MgCl_2$ .

hernd konstant zu werden. Die spez. Trübung in destilliertem Wasser ist sehr schlecht reproduzierbar und zeigt keine klare Abhängigkeit vom Mol.-Gewicht. — Deshalb wurden alle folgenden Messungen in einer 15%-igen Magnesiumchloridlösung ausgeführt. Den Effekt der sinkenden spez. Trübung bei steigendem Magnesiumchloridgehalt möchten wir,

abgesehen von der Änderung des Brechungsexponenten des Lösungsmittels, als Ausdruck einer besseren Solvatation der Glykogenmoleküle deuten.

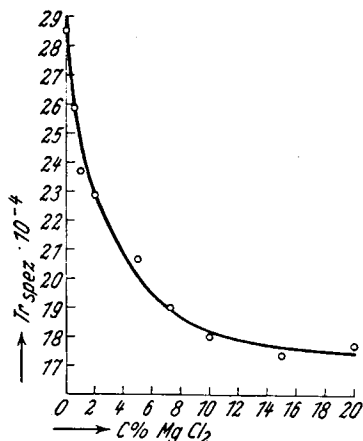


Abb. 1. Abhängigkeit der spez. Trübung von Glykogen vom Magnesiumchloridgehalt des Lösungsmittels ( $M = 1\,700\,000$ ).

Die Messung der relativen Trübung wurde von uns meist mit dem Filter  $L_1$  vorgenommen. Die einzelnen Messungen zeigen bei Verwendung dieses Filters gegenüber dem Filter  $L_2$  wegen der größeren Helligkeit einen geringeren subjektiven Fehler. Außerdem ist zu erwarten, daß das Rayleighsche Gesetz bei der größeren Wellenlänge des Durchlässigkeitsmaximums des Filters  $L_1$  für höhere Mol.-Gewichte gültig ist.<sup>19)</sup> Da es aber üblich ist, die absolute Trübung für Filter  $L_2$  anzugeben<sup>20)</sup>, haben

wir an einigen Produkten die relative Trübung für beide Filter bestimmt (vgl. Tab. 5).

Wie die Tab. 5 zeigt, ist das Verhältnis der relativen Trübung bei den beiden Filtern trotz des sehr verschiedenen Mol.-Gewichtes konstant. Mit dem so ermittelten Quotienten  $L_2/L_1$  haben wir dann alle Trübungen auch für das Filter  $L_2$  ausrechnen können.

Da die Trübung nach dem Rayleighschen Gesetz proportional  $1/\lambda^4$  ist, muß der gefundene Quotient  $(1,72)$  gleich  $\lambda_1^4/\lambda_2^4 = 615^4/533^4 = 1,77$  sein. Die Übereinstimmung ist befriedigend, da man berücksichtigen muß, daß die verwendeten Filter nicht monochromatisch sind. Somit ist also das Rayleigh'sche Gesetz hinsichtlich der Abhängigkeit von der Wellenlänge des Lichtes auch für Glykogenlösungen bestätigt worden.

Zur Ermittlung der spez. Trübung der verschiedenen Glykogene wurde die absolute Trübung bei wechselnder Konzentration der Glykogenlösung unter den oben festgelegten Bedingungen bestimmt. Dabei kann man so vorgehen, daß man eine Lösung laufend verdünnt und deren relative Trübung und Konzentration mißt. Doch ist das Verfahren wegen

<sup>19)</sup> T. Teorell, Kolloid-Z. **53**, 322 (1930).

<sup>20)</sup> Vgl. Gebrauchsanweisung von Zeiss „Mess 430 I“.



Tabelle 5.

Abhängigkeit der relativen Trübung von der Wellenlänge des Lichtes bei Filter  
 $L_1$  ( $\lambda = 615 \mu\mu$ ),  $L_2$  ( $\lambda = 533 \mu\mu$ ).

Glykogen $M$	$c$ g/Liter	$Tr_{rel.} L_1$	$Tr_{rel.} L_2$	$L_2/L_1$
2 200 000	2,8	47,5	82,6	1,74
	2,4	42,1	73,2	1,74
	1,8	32,2	55,1	1,71
	1,4	26,5	46,4	1,75
	7,1	96,4	168,1	1,74
	5,3	73,6	129,0	1,75
1 700 000	4,1	58,0	95,7	1,65
	3,2	44,2	77,0	1,74
	2,8	41,1	70,7	1,73
	2,5	36,6	62,0	1,70
	1,7	25,1	43,0	1,71
	1,3	18,1	31,6	1,75
700 000	4,6	25,6	44,3	1,73
	3,3	18,8	31,9	1,70
	2,4	13,8	24,6	1,78
	1,8	10,8	17,7	1,64
				Mittel 1,72

der großen Empfindlichkeit der Methode gegen Spuren von Staub nur begrenzt anwendbar, da selbst bei vorsichtigstem Arbeiten sich kleine Staubpartikel nicht vollständig fernhalten lassen und man so zu hohe Werte bekommt. Deshalb werden die Glykogenlösungen wiederholt durch ein gehärtetes Filter filtriert und 10 Minuten bei 3500 Umdrehungen zentrifugiert. Die Konzentration der Lösung wird nach der Messung polari-

Tabelle 6.

Bestimmung der spez. Trübung von Glykogen.

Glykogen $M$	$c$ g/Liter	$Tr_{rel.}$	$Tr_{abs.} \cdot 10^4$ $L_1$	$Tr_{spez.} \cdot 10^4$ $L_1$	
2 200 000	5,7	95,2	119,0	20,9	
	4,1	70,2	87,8	21,4	
	3,4	57,6	72,2	21,2	
	2,8	47,5	59,4	21,2	
	2,7	46,1	57,8	21,4	
	2,6	44,6	55,8	21,5	
	2,4	42,1	52,7	22,0	
	1,9	33,1	41,4	21,8	
	1,8	32,2	40,2	22,4	
	1,8	31,5	39,4	21,9	
	1,7	30,8	38,5	22,6	
	1,4	26,5	33,1	23,6	
					Mittel 21,8

Tabelle 6 (Fortsetzung).

Glykogen $M$	$c$ g/Liter	$Tr_{rel.}$	$Tr_{abs.} \cdot 10^4$ $L_1$	$Tr_{spez.} \cdot 10^4$ $L_1$
1 800 000	6,5	96,0	118,0	18,1
	5,2	76,5	95,0	18,2
	5,1	75,4	93,2	18,3
	4,7	70,0	86,9	18,5
	3,9	58,3	72,3	18,5
	3,6	55,1	68,3	19,0
	3,2	46,2	57,4	18,0
	2,9	43,9	54,4	18,7
				Mittel 18,4
1 700 000	7,1	96,4	119,5	16,8
	5,3	73,6	92,1	17,4
	4,1	58,0	72,5	17,7
	3,2	44,2	55,3	17,3
	2,8	41,1	51,3	18,3
	2,5	36,6	45,7	18,3
	1,7	25,1	31,2	18,3
	1,3	18,1	22,6	17,4
			Mittel 17,7	
1 400 000	8,1	93,4	115,5	14,4
	7,1	78,5	97,5	13,6
	6,2	73,0	90,5	14,6
	5,7	64,6	80,0	14,0
	5,4	60,3	74,9	13,9
	4,8	55,4	68,6	14,3
	4,4	48,0	59,5	13,5
	4,0	47,1	58,4	14,6
	2,8	33,2	41,2	14,7
	2,5	28,6	35,4	14,2
	2,0	22,6	28,0	14,0
				Mittel 14,2
700 000	10,2	57,3	71,2	7,0
	9,9	48,6	60,4	6,1
	7,0	36,7	45,5	6,5
	6,4	34,6	42,9	6,7
	4,8	25,8	32,0	6,7
	4,6	25,6	31,8	6,9
	3,8	20,8	25,8	6,8
	3,3	18,8	23,3	7,1
	2,4	13,8	17,1	7,1
				Mittel 6,8
450 000	12,8	49,0	60,9	4,8
	11,7	39,1	48,5	4,2
	11,1	42,1	51,3	4,7
	9,3	31,4	39,0	4,2
	9,0	36,1	44,9	5,0
	8,9	32,4	40,2	4,5
	7,4	29,6	36,6	4,9
	7,0	26,2	32,5	4,6
	4,9	19,3	24,0	4,9
	3,5	13,0	16,1	4,6
				Mittel 4,6

metrisch ( $[\alpha]_D = 196,5^\circ$ )<sup>21</sup>) bestimmt. Von der gemessenen relativen Trübung, die den Durchschnitt von mindestens 10 Ablesungen darstellt, wird ein Leerwert (das ist die relative Trübung des reinen Lösungsmittels) abgezogen. Die so erhaltenen Werte der spez. Trübungen zeigt Tab. 6. Man sieht, daß die absolute Trübung der Konzentration direkt proportional ist. Das Rayleighsche Gesetz ist also für diesen Punkt bestätigt. Die Trübung darf jedoch nicht bei zu hohen Konzentrationen gemessen werden, weil jenseits einer absoluten Trübung von etwa  $120 \cdot 10^{-4}$  diese schwächer als linear mit der Konzentration anzusteigen scheint, wie orientierende Messungen ergaben.

Die spez. Trübung ist also eine für jedes Glykogen charakteristische Größe und nur von dessen Mol.-Gewicht abhängig. Aus dem Verhältnis der spez. Trübung zum Mol.-Gewicht kann man die Konstante  $K_L$  nach der Gl. (6) ausrechnen (vgl. Tab. 7 und Abb. 2).

Tabelle 7.

Abhängigkeit der spez. Trübung von Glykogenen vom Mol.-Gewicht.  
Bestimmung der Konstanten  $K_L$ .

Mol.-Gew.	$Tr_{\text{spez.}} \cdot 10^4$ $L_1$	$Tr_{\text{spez.}} \cdot 10^4$ $L_2$	$K_{L_1} \cdot 10^{10}$	$K_{L_2} \cdot 10^{10}$
2 200 000	21,8	37,7	9,9	17,1
1 800 000	18,4	31,7	10,2	17,6
1 700 000	17,7	30,4	10,4	17,9
1 400 000	14,2	24,4	10,1	17,5
700 000	6,8	11,7	9,7	16,6
450 000	4,6	7,9	10,2	17,6
			Mittel 10,1	17,4

Wie man aus der Tab. 7 und der Abb. 2 sieht, ist die spez. Trübung dem Mol.-Gewicht direkt proportional. Das Rayleighsche Gesetz ist also auch hierin für Glykogen bestätigt. Somit ist die Möglichkeit gegeben, die Mol.-Gewichte von Glykogenen durch ihre spez. Trübung zu bestimmen. Die Fehlergrenze der Methode läßt sich wegen der Polymolekularität der Glykogene<sup>22</sup>) und wegen des wechselnden subjektiven Fehlers beim Photometrieren nicht genau berechnen, doch ist sie, wie aus der Abb. 2 ersichtlich, hinreichend genau. Die Grenze der Methode ist nach unten bei einem Mol.-Gewicht von etwa  $4 \cdot 10^5$  erreicht, da die Messungen bei kleineren Mol.-Gewichten zu ungenau werden. Die Methode findet also

<sup>21</sup>) Z. Gatin-Gruzewska, Pflügers Arch. **102**, 569 (1904).

<sup>22</sup>) Die Polymolekularität bedingt hier den gleichen Fehler wie bei der Molekulargewichtsbestimmung an Fadenmolekülen aus der spezifischen Viskosität nach dem Staudinger'schen Viskositätsgesetz, denn sowohl die spezifische Viskosität als auch die spezifische Trübung sind dem Produkt  $c \cdot M$  proportional.

den direkten Anschluß an die Mol.-Gewichtsbestimmung durch Fällungstiteration. Die obere Grenze der Gültigkeit läßt sich schwer direkt bestimmen, da osmotische Messungen, wie erwähnt, bei so hohen Mol.-Gewichten nicht mehr ausführbar sind. Nach übermikroskopischen Messungen an Glykogenen haben diese bei einem Mol.-Gewicht von  $1,5 \cdot 10^6$  einen Durchmesser von rund  $10 \mu\mu$ .<sup>23)</sup> Das Rayleighsche Gesetz soll bis zu einem Teilchendurchmesser von mindestens  $100 \mu\mu$  gültig sein.<sup>24)</sup> Danach ließe sich die Methode theoretisch bis zu einem Mol.-Gewicht von  $1500 \cdot 10^6$  extrapolieren.

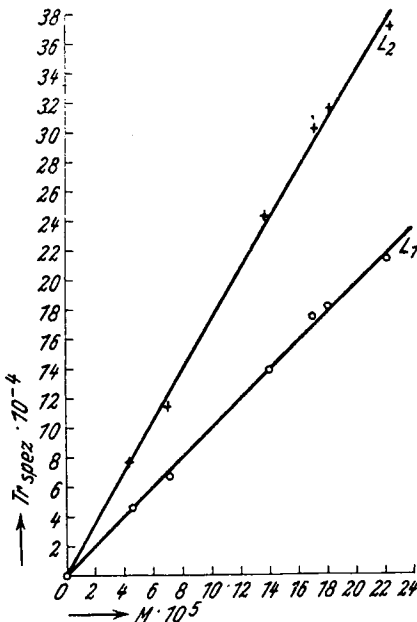


Abb. 2. Abhängigkeit der spez. Trübung von Glykogenen vom Molekulargewicht.

Somit gestattet diese Methode das Mol.-Gewicht der natürlichen sehr hochmolekularen Glykogene schnell, einfach, recht genau und mit einem sehr geringen Substanzaufwand zu bestimmen. Sie ist deshalb zur Untersuchung biologischer Fragen besonders geeignet.

Somit gestattet diese Methode das Mol.-Gewicht der natürlichen sehr hochmolekularen Glykogene schnell, einfach, recht genau und mit einem sehr geringen Substanzaufwand zu bestimmen. Sie ist deshalb zur Untersuchung biologischer Fragen besonders geeignet.

### Zusammenfassung.

Die Gültigkeit des Rayleighschen Gesetzes für Glykogenlösungen wurde geprüft. Die theoretisch geforderte Proportionalität zwischen der Trübung einer Glykogenlösung einerseits und der Konzentration, dem Molekulargewicht und dem reziproken Wert der 4. Potenz der Wellenlänge des Lichtes andererseits konnte experimentell bestätigt werden. Eine einfache Mol.-Gewichtsbestimmung an Glykogenen ist somit nach der Gleichung gegeben:

$$Tr_{\text{spez.}} = K_L \cdot M.$$

Die Konstante  $K_L$  wurde in 15%-iger Magnesiumchloridlösung für das Filter  $L_1$  ( $\lambda = 615 \mu\mu$ ) zu  $10,1 \cdot 10^{-10}$  und für das Filter  $L_2$  ( $\lambda = 533 \mu\mu$ ) zu  $17,4 \cdot 10^{-10}$  bestimmt.

<sup>23)</sup> E. Husemann u. H. Ruska, J. prakt. Chem. [2], 156, 1 (1940).

<sup>24)</sup> A. W. Owe, Kolloid-Z. 32, 73 (1923); W. Mecklenburg, Kolloid-Z. 16, 97 (1915); F. V. v. Hahn, Dispersoidanalyse, Dresden 1928, S. 94.