

Untersuchungen an hochgereinigten Glykogensolen.

Von

M. Pantlitschko und J. Matula.

Aus dem Institut für medizinische Kolloidchemie der Universität Wien.

Mit 3 Abbildungen.

(Eingelangt am 20. Juni 1949. Vorgelegt in der Sitzung am 23. Juni 1949.)

In einer Reihe von Arbeiten untersuchte *W. Pauli*¹⁻³ mit seinen Mitarbeitern das elektrochemische Verhalten von Kohlehydratsolen (wie Stärke, Dextrine, Gummiarabicum und Agar), bei denen die Fremdelektrolyte durch Dialyse und Elektrodialyse möglichst vollständig entfernt worden waren. Diese Kohlehydrate sind in wäßriger Lösung schwach negativ aufgeladen, stellen also riesige Anionen vor, denen eine äquivalente Menge von positiven Ionen, wie Alkali- und Erdalkaliumionen, gegenübersteht. Bei fortschreitender Dialyse werden diese Kationen entfernt und an ihre Stelle treten die H-Ionen des Wassers. Bei vollständiger Reinigung liegt dann ein sogenanntes azidoides Sol oder eine Kolloidsäure vor, wodurch für viele Untersuchungen besonders einfache und übersichtliche Verhältnisse geschaffen werden. So konnte *M. Samec*⁴ an derart gereinigten Stärkesolen als erster die Veresterung der Stärke mit Phosphorsäure feststellen. *Pauli* (l. c.) und Mitarbeiter bestimmten in solchen azidoiden Kohlehydratsolen durch elektrometrische Titration mit Natron- bzw. Barytlaug die Gesamtazidität; diese Gesamtazidität ist nun größer als die aus dem Phosphorsäuregehalt errechnete, bzw. wurde auch im phosphorfreien Sol eine mit verdünnter NaOH bzw. Ba(OH)₂ titrierbare Azidität gefunden, die auf die Anwesenheit einer mittelstarken Säure schließen läßt. *Pauli*³ glaubte Grund zur Annahme zu haben, daß es sich um Glukuronsäure bzw. allgemeiner um Uronsäuren

¹ *W. Pauli* und *L. Palmrich*, Kolloid-Z. **79**, 174 (1937).

² *W. Pauli* und *J. Szper*, Kolloid-Z. **82**, 335 (1938).

³ *W. Pauli* und *L. Sternbach*, Helv. chim. Acta **24**, 317 (1941).

⁴ *M. Samec* und *H. Haerd*t, Kolloidchem. Beih. **12**, 280 (1920).

handle und vermutete, daß auch andere Kohlehydrate und insbesondere das Glykogen gleichfalls derartige Uronsäuregruppen enthalten dürfte.

Als wesentlicher Unterschied gegenüber der Stärke galt der angeblich um etwa eine Zehnerpotenz geringere Phosphorgehalt des Glykogens. Neuere Untersuchungen zeigten, daß der P-Gehalt des Glykogens noch niedriger liegt, so gibt *H. Staudinger*⁵ für ein Präparat aus Miesmuschel, das 16mal aus Alkohol umgefällt wurde, einen P-Gehalt von 0,016% an. Ähnliche Werte fanden *M. Macdowell*⁶, *L. G. Petree* und *C. L. Alsberg*⁷. *G. J. Bell* regenerierte Glykogene aus einem Acetyl- und Benzoylderivat und fand eine Verminderung des P-Gehaltes auf ein Viertel des obigen Wertes, in einzelnen Fällen waren die Präparate phosphorfrei. Auch *K. H. Meyer* hat phosphorfreies Glykogen aus Muschelfleisch hergestellt.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Untersuchung von Glykogensolen verschiedener Herkunft nach folgenden Hauptgesichtspunkten:

1. Wie weit läßt sich der Phosphorgehalt durch eine möglichst schonende Behandlung, wie es die Dialyse bzw. Elektrodialyse ist, herabsetzen?

2. Sind neben der Phosphorsäure noch andere Säuren für den sauren Charakter des Glykogens verantwortlich?

3. Sind diese Säuren Uronsäuren, bzw. gelingt ihr direkter Nachweis?

4. Schließlich wurde noch das elektrische Leitvermögen und die Viskosität der hochgereinigten Glykogensole untersucht.

Die Anregung zu dieser Untersuchung stammt von Prof. *W. Pauli* in Zürich, dem wir auch für seine freundlichen brieflichen Ratschläge und die Durchsicht des Manuskriptes zu Dank verpflichtet sind.

Darstellung und Reinigung des Glykogens durch Elektrodialyse und Elektrodekantation.

Als Untersuchungsmaterial dienten Glykogenpräparate verschiedener Herkunft und Darstellungsweise. Sie wurden aus Lebern von Kaninchen und Meerschweinchen und aus Muskeln von Kaninchen gewonnen, außerdem wurde ein Präparat der Firma *Merck* verwendet, das aus dem Fleisch der Miesmuschel (*Mytilus edulis*) gewonnen worden war. Die Gewinnung des Leber- und Muskelglykogens erfolgte zum Teil nach der klassischen Methode von *Pflüger*⁸ durch Hydrolyse der Organe in 60%iger Kalilauge bei 100° C, zum Teil nach der von *Rona* und *Eweyck*⁹ angegebenen Art durch Extraktion der Organe in 5%iger Trichloressigsäure. Das *Mercksche* Präparat wurde nach Angabe der Firma durch Extraktion aus Muschelfleisch in heißem Wasser und nachfolgende Behandlung mit Trichloressigsäure gewonnen.

⁵ *H. Staudinger* und *E. Huxmann*, Liebigs Ann. Chem. **530**, 1 (1937).

⁶ *M. Macdowell*, Chem. Zbl. **1929 I**, 2788.

⁷ *L. G. Petree* und *C. L. Alsberg*, J. biol. Chem. **82**, 385 (1929).

⁸ *E. Pflüger*, Das Glykogen, 2. Aufl. Bonn. 1906.

⁹ *P. Rona* und *C. von Eweyck*, Biochem. Z. **149**, 174 (1924).

Vor ihrer weiteren Reinigung wurde der Aschen- und Phosphorgehalt, die spezifische Drehung sowie die elektrische Leitfähigkeit und der p_H -Wert der 1%igen Lösung ermittelt.

Wie die untenstehende Tabelle I zeigt, schwankt der Phosphorgehalt der Rohpräparate innerhalb ziemlich enger Grenzen, etwa um 0,13%; das p_H der 1%igen Lösung liegt in der Nähe des Neutralpunktes und läßt einen Einfluß der Herstellungsmethode erkennen, da die mit Trichloressigsäure hergestellten Präparate nahezu neutral ($p_H = 7,3$), die nach der *Pflügerschen*⁹ Methode mittels KOH-Hydrolyse gewonnenen ganz schwach alkalisch (p_H zirka 8,2) reagieren. Die p_H -Werte sowie der Phosphorgehalt sind im Hinblick auf die Änderung, die sie bei der Reinigung durch Elektrodialyse erfahren, von besonderem Interesse.

Tabelle I.

Ausgangsmaterial	Darstellung	P-Ge- halt in %	Prozent Asche	Spez. Dre- hung	Leitfähigkeit der 1% Lsg. rez. Ohm	p_H der 1% Lsg.
I. Leber (Kaninchen)	<i>Pflüger</i> und <i>Grabe</i>	0,115	0,145	197	$5,96 \cdot 10^{-3}$	8,10
II. Leber (Meer- schweinchen)	<i>Pflüger</i> und <i>Grabe</i>	0,124	0,275	199	—	8,39
III. Leber (Meer- schweinchen)	<i>Rona</i> und <i>Eweyck</i>	0,163	—	194	$8,20 \cdot 10^{-3}$	7,29
IV. Muskel (Kanin- chen)	<i>Pflüger</i> und <i>Grabe</i>	0,135	0,203	—	$6,50 \cdot 10^{-3}$	8,53
V. Muschelfleisch	Handelsprä- parat der Firma <i>Merck</i>	0,126	0,12	192	$6,40 \cdot 10^{-3}$	7,29

Der Aschengehalt und die elektrische Leitfähigkeit stehen offensichtlich mit dem Reinheitsgrad der Präparate im Zusammenhang. Die qualitative Untersuchung der Asche ergab neben Spuren von Eisen hauptsächlich die Anwesenheit von Calcium, Magnesium und Kalium. Der Mittelwert der optischen Drehung (194°) kommt dem von *Gruzsewska*¹⁰ und *Huppert*¹¹ gefundenen Wert von $196,5^\circ$ recht nahe.

Von den Glykogenpräparaten wurden 1%ige Sole hergestellt und diese nun im Elektrodialysierapparat nach *Pauli* elektrodialysiert. Im Verlauf der Elektrodialyse tritt im Inhalt der Mittelzelle (wie dies auch bei anderen Solen der Fall ist) eine scharfe Sonderung in zwei Schichten auf (Elektrodekantation), in eine untere, welche das Glykogen enthält und in eine rein wäßrige Oberschicht, die man abheben und durch destilliertes Wasser ersetzen kann. Dadurch wird einerseits der Reinigungsvorgang beschleunigt, andererseits eine Konzentrierung des Sols bis auf 5% erzielt. Die Dialyse wird so lange fortgesetzt, bis die obere Schicht die Leitfähigkeit der unteren Schicht erreicht und durch mindestens 2 Tage konstant bleibt. Eine ausführliche Beschreibung der Elektrodekantation hat *W. Pauli* gegeben¹².

¹⁰ *Z. Gruzsewska*, *Pflügers Arch. ges. Physiol. Menschen Tiere* **102**, 569 (1904).

¹¹ *H. Huppert*, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **18**, 137 (1894).

¹² *W. Pauli*, *Helv. chim. Acta* **25**, 137 (1942).

Auf diese Weise wurde eine Reihe hochgereinigter Glykogensole erhalten, die das Versuchsmaterial für die weiteren Untersuchungen bildeten. In Tabelle 2 ist der Gehalt dieser Sole an Glykogen, ihr Phosphorgehalt sowie der Phosphorgehalt des Glykogens und die spezifische Drehung verzeichnet.

Tabelle 2.

Bezeichnung der Sole	Ausgangsmaterial und Darstellung	Glykogengehalt in %	P-Gehalt der Lösung in Mol $\times 10^{-5}$	P-Gehalt des Glykogens in %	Spez. Drehung in Grad	Dauer ED + EDek Tage
A	<i>Merck</i> -Präparat aus Muschelfleisch ...	1,69	7,10	0,0126	195,8	16
B	<i>Merck</i> -Präparat aus Muschelfleisch ...	1,20	5,07	0,0127	—	17
C	<i>Merck</i> -Präparat aus Muschelfleisch ...	1,50	7,59	0,0157	—	17
E	<i>Merck</i> -Präparat aus Muschelfleisch ...	1,06	4,95	0,0152	197,3	18
G	<i>Merck</i> -Präparat aus Muschelfleisch ...	2,28	10,80	0,0147	—	16
H	<i>Merck</i> -Präparat aus Muschelfleisch ...	2,49	11,00	0,0146	—	14
L ₁	Kaninchenleber nach <i>Pflüger</i> ...	3,63	17,90	0,0158	195,8	17
L ₁₂	Kaninchenleber nach <i>Pflüger</i> ...	4,00	19,00	0,0151	196,0	20
L ₂	Meerschweinchenleber nach <i>Pflüger</i>	4,20	19,30	0,0142	197,2	19
L ₃	Meerschweinchenleber nach <i>Rona</i> und <i>Eweyck</i> ...	3,12	16,10	0,0160	196,8	18
M	Kaninchenmuskel nach <i>Pflüger</i> ...	1,86	9,00	0,0151	196,7	16
Mittelwert ...				0,0147	196,5	

Die Sole zeigten leichte Opaleszenz und waren nahezu farblos. Sie reagierten deutlich sauer, das p_H liegt je nach Konzentration zwischen 3,5 bis 4 (vgl. Tabelle 6). Der Mittelwert der optischen Drehung ist identisch mit dem in der Literatur angegebenen Wert (siehe oben).

Der Phosphorgehalt des elektrodialysierten Glykogens.

Durch die Elektrodialyse und E-Dekantation wird der größte Teil des Phosphors, der ursprünglich in den Rohpräparaten vorhanden war, entfernt. Aus der folgenden Tabelle 3 ist die Verminderung des Phosphorgehaltes für die verwendeten fünf Rohpräparate verschiedener Herkunft und Darstellung zu ersehen.

Der verbleibende Rest, der auch bei weiterer Fortsetzung der Elektrodialyse nicht mehr verringert werden kann, zeigt bei allen Präparaten

trotz ihrer verschiedenen Herkunft und Darstellung eine auffallende Übereinstimmung, er beträgt im Mittel etwa 0,015%.

Tabelle 3. Verminderung des P-Gehaltes durch Elektrodialyse.

Ausgangsmaterial	Darstellungsmethode	P-Gehalt vor der E. D.	P-Gehalt nach der E. D. in %	Verminderung des P in %
Kaninchenleber	<i>Pflüger und Gräbe</i>	0,115	0,0153	86
Kaninchenmuskel	<i>Pflüger und Gräbe</i>	0,135	0,0151	89
Meerschweinchenleber . .	<i>Pflüger und Gräbe</i>	0,223	0,0142	88
Meerschweinchenleber . .	<i>Rona und Eweyck</i>	0,163	0,0160	90
Muschelfleisch	Handelspräparat	0,127	0,0152	88

Da der Gedanke naheliegt, daß die Entfernung des Phosphors auf eine durch die Elektrodialyse bewirkte Abspaltung einer ursprünglich veresterten Phosphorsäure zurückzuführen ist, wurde folgender Versuch unternommen: Ein hochgereinigtes Glykogensol (L_1) wurde nach der Methode von *J. Kerb*¹³ phosphoryliert (mit $POCl_3$). Dadurch wurde der Phosphorgehalt von 0,0153 auf 1,556 erhöht¹⁴.

Das phosphorylierte Glykogen war nach seiner Ausfällung durch Alkohol in Wasser unlöslich. Es konnte daher mit Wasser bis zum Verschwinden der überschüssigen Phosphat- und Chlorionen gewaschen werden. Es stellt ein rein weißes Pulver vom Aussehen des natürlichen Glykogens vor, ist aber, wie erwähnt, nicht ohne weiters in Wasser löslich, sondern quillt nur etwas auf. Mit Jod färbt es sich, wie das normale Glykogen, rotbraun. Es war hingegen in 10- bis 15%iger Kalilauge leicht löslich.

Das in Kalilauge gelöste Präparat wurde mit Essigsäure neutralisiert, wobei es in Lösung bleibt, und konnte nun ohne auszufallen neuerlich elektrodialysiert werden. Es erfolgt auch bei tagelanger Dialyse keine wesentliche Änderung des P-Gehaltes, ebenso verhielt sich das gereinigte, aber nicht phosphorylierte Sol L_1 bei gleicher Behandlung (siehe Tabelle 4).

Die veresterte Phosphorsäure wird demnach durch Elektrodialyse nicht in nennenswerter Menge abgespalten.

¹³ *J. Kerb*, Biochem. Z. **100**, 3 (1919).

¹⁴ Abweichend von der Vorschrift nach *J. Kerb* wurde die bei der Phosphorylierung freiwerdende Salzsäure nicht mit Calciumkarbonat abgestumpft, sondern es wurde vorsichtig die zur Neutralisation der Salzsäure notwendige Menge Kalilauge zugesetzt. Dadurch konnte der P-Gehalt in einem Akt von 0,0153% auf 1,56% hinaufgesetzt werden. Bei der ursprünglichen Vorschrift gelingt es nicht, den P-Gehalt bei einmaliger Phosphorylierung über 1% zu bringen. *W. Z. Hassid* und *J. L. Chaikoff*, welche ebenfalls Glykogen phosphorylierten, mußten den Vorgang siebenmal wiederholen, bis sie einen P-Gehalt von 1,73% erreichten.

Tabelle 4.

	Phosphorgehalt vor der E. D. in %	Phosphorgehalt nach der E. D. in %
Phosphoryliertes Glykogensol L ₁	1,556	1,552
Glykogensol L ₁	0,0153	0,0151

Eine weitere Herabsetzung des P-Gehaltes ist nur nach Erhitzen im Autoklaven möglich. Das Sol L₁ wurde 40 Min. lang im Autoklaven auf 140° C erhitzt und darnach elektrodialysiert. Der Phosphorgehalt sank dabei etwa um die Hälfte von 0,0153% auf 0,0074% ab. Dabei findet aber bereits ein Abbau des Glykogens statt, wie das Auftreten reduzierender Substanzen, sowie das Aussehen des Sols beweist. Während das phosphorylierte und das gereinigte Sol nahezu klar — nur leicht opaleszent — und farblos sind, ist das wie oben behandelte Sol stark trüb und gelb gefärbt.

Der auffällig konstante Phosphorgehalt des elektrodialysierten Glykogens entspricht also tatsächlich der als Ester gebundenen Phosphorsäure und ist in guter Übereinstimmung mit den in der Einleitung erwähnten Werten, die *Staudinger*¹⁵ und andere Forscher an auf andere Weise gereinigten Glykogenpräparaten feststellten. Damit fällt die in der Literatur vielfach anzutreffende Behauptung weg, daß der Unterschied zwischen Stärke und Glykogen hauptsächlich im höheren Phosphorgehalt der ersteren liegen sollte. *Samec* gibt in seiner „Kolloidchemie der Stärke“ für hochgereinigte Stärkepräparate verschiedener Herkunft folgende Werte an: Kartoffel 0,112% P, Reis 0,039% P, Weizen 0,105% P, Herbstzeitlose 0,016% P.

Es besitzt also jede Stärkeart ihren individuellen Phosphorwert, der meist, aber nicht immer, höher ist als der des Glykogens. Der P-Gehalt des Glykogens ist aber unabhängig von Herkunft und Gewinnung konstant. Der Unterschied beider Kohlehydrate ist wohl in erster Linie in der Struktur gelegen.

pH und Leitfähigkeit.

Die elektrodialysierten Glykogensole reagieren zum Unterschied von den neutralen oder leicht alkalisch reagierenden Ausgangsolen deutlich sauer. Die Elektrodialyse hat ihre Umwandlung in azidoide Sole oder Kolloidsäuren (Glykogenphosphorsäuren) bewirkt; großen kolloiden Anionen stehen H-Ionen als Gegenionen gegenüber. Die elektrische Leitfähigkeit der gereinigten Sole ist im Fall einer restlosen

¹⁵ *H. Staudinger*, Organische Kolloidchemie, 2. Aufl. 1941.

Überführung in ein azidoides Sol nur durch das Leitvermögen des Kolloidions und der vorhandenen H-Ionen bedingt. Man kann daher aus der Leitfähigkeit des Sols annähernd die H^+ -Aktivität berechnen; diese müßte dann mit der direkt gemessenen H^+ -Aktivität übereinstimmen, da bei den vorliegenden geringen Konzentrationen Aktivitäts- und Leitfähigkeitskoeffizient praktisch übereinstimmen.

Es wurden daher die spezifischen Leitfähigkeiten der einzelnen Sole gemessen und ihr p_H bzw. ihre H^+ -Aktivität potentiometrisch bestimmt. Aus der spezifischen Leitfähigkeit wurde aus dem bekannten Äquivalentleitvermögen des H-Ions ($U = 350$) und unter der plausiblen Annahme, daß das Äquivalentvermögen des kolloiden Anions $V = 50$ rez. Ohm beträgt¹⁶, die H^+ -Aktivität berechnet. In der Tabelle 5 sind die untersuchten Sole nach ihrer Glykogenkonzentration geordnet. In der ersten Kolonne sind die spezifischen Leitfähigkeiten der Sole, in der zweiten die elektrometrisch gemessenen p_H -Werte und die entsprechenden H^+ -Aktivitäten a_H verzeichnet. In der letzten Kolonne sind die aus der Leitfähigkeit berechneten H^+ -Konzentrationen angegeben.

Tabelle 5.

Sol	% Glykogen	Spez. Leitfähigkeit 10^{-5}	p_H	a_H	a_H aus Leitfähigkeit berechnet
			gemessen		
E	1,06	4,22	3,99	$1,02 \cdot 10^{-4}$	$1,05 \cdot 10^{-4}$
B	1,20	4,47	3,99	$1,02 \cdot 10^{-4}$	$1,10 \cdot 10^{-4}$
C	1,50	6,24	3,82	$1,51 \cdot 10^{-4}$	$1,56 \cdot 10^{-4}$
A	1,69	5,35	3,85	$1,41 \cdot 10^{-4}$	$1,35 \cdot 10^{-4}$
M	1,86	7,65	3,76	$1,74 \cdot 10^{-4}$	$1,91 \cdot 10^{-4}$
G	2,28	8,30	3,66	$2,19 \cdot 10^{-4}$	$2,18 \cdot 10^{-4}$
H	2,49	8,80	3,65	$2,29 \cdot 10^{-4}$	$2,22 \cdot 10^{-4}$
L_3	2,82	11,80	3,55	$2,82 \cdot 10^{-4}$	$2,95 \cdot 10^{-4}$
L_1	3,47	13,70	3,46	$3,47 \cdot 10^{-4}$	$3,43 \cdot 10^{-4}$
L_{12}	4,00	16,30	3,44	$3,56 \cdot 10^{-4}$	$4,07 \cdot 10^{-4}$
L_2	4,20	12,70	3,48	$3,48 \cdot 10^{-4}$	$3,18 \cdot 10^{-4}$

Die Übereinstimmung zwischen den berechneten und gemessenen H^+ -Aktivitäten ist, wie die beiden letzten Kolonnen der Tabelle 5 zeigen, tatsächlich eine recht gute und ein Beweis, daß die elektrodialysierten Glykogenlösungen rein azidoide Sole (Kolloidsäuren) sind, das heißt, sie enthalten außer H-Ionen keine anderen Kationen.

¹⁶ Vgl. *W. Pauli und J. Szper*, Kolloid-Z. 82, 335 (1938), die bei analogen Berechnungen bei Dextrinen und löslicher Stärke für die Beweglichkeit des kolloiden Anions ebenfalls den mittleren Wert von 50 rez. Ohm verwendeten.

Die konduktometrische Titration der Glykogensole.

Die Gesamtazidität läßt sich durch p_H -Bestimmungen oder Leitfähigkeitsmessungen nicht ermitteln, da wegen der unvollständigen Dissoziation der größere Teil der H-Ionen inaktiv ist. Diese kann vielmehr durch Titration gegen eine starke Lauge ermittelt werden. Die Glykogensole wurden konduktometrisch gegen CO_2 -freie Natronlauge bzw. Barytlauge titriert. Die Leitfähigkeit sinkt infolge des Verschwindens der H-Ionen, erreicht im Neutralitätspunkt ein Minimum und steigt

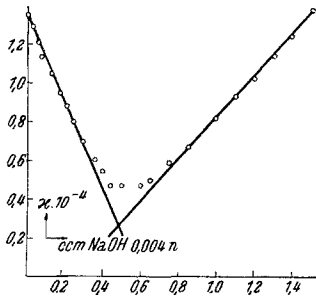


Abb. 1.

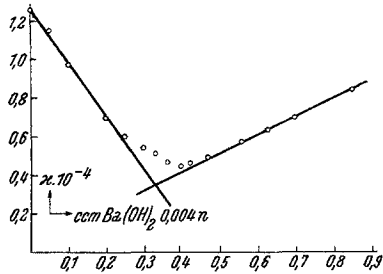


Abb. 2.

bei Laugenüberschuß rasch an. Dieses Minimum ist in unserem Falle, wo es sich um eine schwächere Säure handelt, infolge der Hydrolyse des gebildeten Salzes verbreitert, und der Neutralitätspunkt wurde daher graphisch durch den Schnittpunkt der an die steilen Kurvenäste der Titrationskurve gelegten Tangenten ermittelt. In den beiden Tabellen 6a und 6b ist als Beispiel der Verlauf der Titration des Sols L_1 gegen 0,004 n Natronlauge, bzw. 0,004 n Barytlauge wiedergegeben. Die Titration geschah in einem eigenen, mit einer Mikrobürette versehenen Leitfähig-

Tabelle 6a. Titration von Sol L_1 mit NaOH.
3 ccm Sol L_1 + 0,004 n NaOH.

ccm NaOH	Leitfähigkeit 10^{-4} rez. Ohm	Leitfähigkeit kor. 10^{-4}	ccm NaOH	Leitfähigkeit 10^{-4}	Leitfähigkeit kor. 10^{-4}
0,00	1,37	1,37	0,50	0,402	0,468
0,03	1,28	1,29	0,60	0,394	0,473
0,06	1,19	1,21	0,65	0,412	0,502
0,694	1,10	1,13	0,75	0,471	0,590
0,13	1,01	1,05	0,85	0,521	0,669
0,17	0,897	0,948	1,00	0,615	0,820
0,21	0,828	0,881	1,10	0,676	0,925
0,25	0,740	0,802	1,20	0,736	1,03
0,30	0,635	0,698	1,30	0,792	1,14
0,356	0,544	0,609	1,40	0,845	1,24
0,402	0,485	0,550	1,50	0,930	1,39

keitsgefäß. Die graphische Darstellung des Titrationsverlaufes ist aus Abb. 1 und 2 zu ersehen.

Tabelle 6b.
2 ccm Sol L₁ + 0,004 n Ba(OH)₂.

ccm BaOH	Leitfähigkeit × 10 ⁻⁴ rz. Ohm	Leitfähigkeit korr. 10 ⁻⁴	ccm BaOH	Leitfähigkeit × 10 ⁻⁴	Leitfähigkeit korr. × 10 ⁻⁴
0,00	1,24	1,24	0,39	0,370	0,443
0,05	1,14	1,15	0,42	0,370	0,460
0,10	0,912	0,966	0,47	0,389	0,481
0,20	0,629	0,692	0,56	0,436	0,557
0,25	0,531	0,598	0,63	0,472	0,620
0,30	0,467	0,537	0,70	0,513	0,692
0,33	0,435	0,507	0,85	0,597	0,840
0,36	0,392	0,462			

Der Schnittpunkt der an die steilen Kurvenäste (Abb. 1 und 2) gelegten Tangenten ergibt, daß zur Neutralisation von 3 ccm Sol mit 0,004 n Natronlauge 0,485 ccm Lauge zur Titration von 2 ccm Sol mit 0,004 n Barytlauge 0,335 ccm Lauge erforderlich waren. Daraus berechnet sich für die Gesamtazidität c_H eine Konzentration von $6,60 \times 10^{-4} n$ bzw. $6,65 \times 10^{-4} n$.

Derartige Titrations wurden auch bei anderen Solen durchgeführt. Dabei zeigte sich, daß die durch Titration mit Natronlauge bzw. Barytlauge erhaltenen Werte nicht, wie im angeführten Beispiel immer übereinstimmen, sondern öfters beträchtlich voneinander abweichen (Tabelle 7).

Die Titration mit Barytlauge und Natronlauge führt demnach nur bei den konz. Solen zu annähernd gleichen Ergebnissen, bei den verd. Solen liegen die mit Barytlauge erhaltenen

Tabelle 7. Gesamtazidität (c_H), ermittelt aus der konduktometrischen Titration mit Natron- bzw. Barytlauge.

Sol	% Glykogen	$c_H \cdot 10^4$ titr. mit Na(OH)	$c_H \cdot 10^{-4}$ titr. mit Ba(OH) ₂
B	1,20	1,47	2,70
A	1,69	1,57	3,29
M ₂	1,86	2,52	3,51
L ₁	3,63	6,60	6,65
L ₁₂	4,00	6,29	6,61
L ₂	4,20	6,08	6,21

Werte durchwegs höher als die Natronlaugewerte. Diese Differenz der Titrationskurven von Natron- und Barytlauge ist schon von *Pauli*¹⁷⁻²⁰ auch bei anderen azidoiden Kolloidsolen, sowohl anorganischen als

¹⁷ W. Pauli und A. Laub, Kolloid-Z. 78, 295 (1937).

¹⁸ W. Pauli und W. Kölbl, Kolloid-Z. 80, 175 (1937).

¹⁹ W. Pauli und Th. Schild, Kolloid-Z. 72, 165 (1936).

²⁰ W. Pauli und J. Baczewski, Kolloid-Z. 69, 69 (1935).

organischen, beobachtet und damit erklärt worden, daß die Inaktivierung und die Anlagerung beim Bariumion größer als beim Natriumion ist, das heißt, die gut löslichen Natriumsalze schwächerer Säuren erfahren in höherer Verdünnung eine stärkere Hydrolyse als die schwerlöslichen Bariumsalze. In höheren Konzentrationen wird diese Hydrolyse zurückgedrängt und die Titrationswerte mit Natronlauge nähern sich jenen mit Barytlauge erhaltenen. Jedenfalls werden die inaktiven H-Ionen durch Barytlauge vollständiger als durch Natronlauge erfaßt.

Wäre nun die Gesamtazidität des Glykogens bloß durch die mit ihm veresterten Phosphorsäuren bedingt, so müßte das Ergebnis der Titration mit dem Phosphorsäuregehalt in Übereinstimmung stehen. Wie aus folgender Tabelle 8 hervorgeht, ist dies aber nicht der Fall, die Gesamtazidität ist beträchtlich größer. In dieser Tabelle ist die durch Titration mit Barytlauge ermittelte Gesamtazidität (c_H) sowie die maximale Konzentration der aus der Phosphorsäure stammenden H-Ionen (n_H) angegeben. Letztere wurde aus dem Phosphorgehalt (vgl. Tabelle 2) errechnet unter Berücksichtigung des Umstandes, daß man der im Glykogen vorhandenen Phosphorsäure nur zwei dissoziablen H-Ionen zuordnen kann. Das dritte dient zur Veresterung mit dem Glykopyranoseresst. In der letzten Kolonne der Tabelle ist die Differenz beider Werte $c_H - n_H$ verzeichnet.

Tabelle 8.

Sol	% Glykogen	$c_H \cdot 10^{-4}$	$n_H \cdot 10^{-5}$	$c_H - n_H \cdot 10^{-4}$
E	1,06	2,59	0,99	1,50
B	1,20	2,70	1,14	1,56
A	1,69	3,29	1,42	1,87
C	1,50	3,15	1,52	1,63
M	1,86	3,51	1,80	1,71
L_3	3,11	5,10	3,10	2,00
L_1	3,63	6,65	3,58	3,07
L_{12}	4,00	6,61	3,80	2,81
L_2	3,20	6,21	3,86	2,35

Daraus geht hervor, daß neben der veresterten Phosphorsäure noch andere saure Gruppen vorhanden sein müssen.

Wie schon erwähnt, haben *Pauli* und *Szper*² durch elektrometrische Titration phosphorhaltiger hochgereinigter Dextrine und Stärkepräparate saure Gruppen neben der Phosphorsäure festgestellt. Desgleichen wurden auch bei phosphorfreen Dextrinen und Stärkepräparaten bemerkenswerte Mengen saurer Gruppen festgestellt, die nach ihrem elektrochemischen Verhalten einer mittelstarken Säure entsprechen. Aus dem elektrochemischen Verhalten zogen die Verfasser den Schluß, daß es sich höchstwahrscheinlich um Uronsäuregruppen handeln müsse. Auch

bei anderen hochpolymeren Kohlehydraten, wie Tragant, Gummi-arabicum, führen *Pauli* und Mitarbeiter³ den sauren Charakter auf Glukuronsäure bzw. Uronsäure zurück. Direkt festgestellt wurde Glukuronsäure von *E. Schmidt*²¹ in Buchenholzcellulose, in gebleichter Strohcellulose haben *K. G. Schwalbe* und *Feldmann*²² diese Säuren auch quantitativ bestimmt.

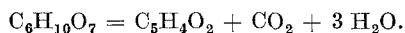
Es wurde daher versucht, die Glukuronsäure im Glykogen direkt qualitativ und quantitativ nachzuweisen.

Nachweis der Glukuronsäure im Glykogen.

Zum qualitativen Nachweis der Glukuronsäure im Glykogen wurde die Naphthoresorcinprobe nach *Tollens* versucht. 5 ccm der fraglichen Lösung wurden mit 0,5 bis 1 ccm einer 1% alkohol. Naphthoresorcinlösung und der gleichen Menge konz. Salzsäure versetzt und aufgekocht. Nach Abkühlung wird die Probe mit Äther geschüttelt. Bei Anwesenheit von Glukuronsäure färbt sich der Ätherauszug rot bis blauviolett. In unserem Fall liegt die Schwierigkeit darin, daß die Glukuronsäure, falls überhaupt vorhanden, in sehr geringer Menge neben einem Überschuß von Glukose anwesend ist.

Glykogen ergab nun bei der Anstellung der *Tollens*schen Probe einen rot gefärbten Ätherauszug. Da dieser Befund uns nicht eindeutig genug erschien, wurden die Ätherauszüge mehrerer Proben vereinigt, der Äther am Wasserbad abgedampft, der Rückstand in Salzsäure gelöst und nochmals die Naphthoresorcinprobe durchgeführt. Der Ätherauszug zeigte nun die für den positiven Ausfall der Probe charakteristische tiefe Violettfärbung und im Spektroskop die für diesen Farbstoff kennzeichnenden Absorptionsstreifen nahe der *D*-Linie. Eine Auswertung der Probe für eine quantitative kolorimetrische Bestimmung der Glukuronsäure mißlang, da anwesende Aldehyde und Ketone das Naphthoresorcin abfangen und die Resultate stören.

Es wurde daher zur quantitativen Bestimmung kleiner Glukuronsäuremengen neben einem Überschuß von Glukose die Glukuronsäurebestimmung von *Tanabe* versucht. Dieses Verfahren beruht darauf, daß beim Erhitzen von Glukuronsäure mit konz. Salzsäure Furfurol gebildet wird:



Dieser Aldehyd wird mit Natriumbisulfit in die Additionsverbindung übergeführt, das überschüssige Bisulfit durch Jod oxydiert und der Überschuß von Jod mit Natriumthiosulfat titriert. Um die Brauchbarkeit dieser Methode für den vorliegenden Zweck zu überprüfen, wurden zuerst Proben, die bekannte kleine Mengen von Glukuronsäure neben einem Überschuß diverser Zuckerarten enthielten, untersucht.

Die Glukuronsäure wurde nach der Vorschrift von *Neuberg* und *Lachmann* aus dem Harn von mit Menthol gefütterten Kaninchen als Ammoniumsalz der Mentholglukuronsäure analysenrein hergestellt. Auf die Darstellung der freien Glukuronsäure wurde wegen ihrer Unbeständigkeit verzichtet. Das Salz wird zuerst mit eiskaltem Ammoniakwasser und mit kaltem Wasser

²¹ *E. Schmidt*, Ber. dtsch. chem. Ges. **70**, 2345 (1937).

²² *K. G. Schwalbe* und *G. A. Feldmann*, Ber. dtsch. chem. Ges. **58**, 1534 (1925).

gewaschen. Die vollständige Reinigung gelingt leicht durch Auflösen des Salzes in kalter 8% Schwefelsäure und Ausschütteln mit Äther. Nach zwei- bis dreimaliger Wiederholung erhält man rein weiße Nadeln, die sich leicht verfilzen. Ein genauer Schmelzpunkt läßt sich nicht bestimmen, da schon vorher eine Zersetzung unter Ammoniakabscheidung erfolgt. Der ungefähre Schmelzpunkt liegt bei 170 bis 180°. Die von *Neuberg* und *Lachmann* behauptete leichte Zersetzlichkeit des Ammoniumsalzes unter Ammoniakabspaltung konnte nicht bestätigt werden. Auch bei tagelangem Trocknen über konz. Schwefelsäure wurde keine Gewichtsabnahme beobachtet.

Zunächst wurden Testbestimmungen bei Anwesenheit von Glucose vorgenommen. Es zeigte sich jedoch, daß die Handelsglucose wesentliche Mengen furfurolbildender Substanzen enthält. Dies hatte schon 1909 *Neuberg* festgestellt und daraus auf einen Fehler der Methode *Tanabes* geschlossen. Nun wird die Glucose aber in der Technik aus Stärke dargestellt, die nach *Pauli* und *Szper*² Glukuronsäure enthält. Es wurden daher andere Zuckerarten, wie Galaktose, Fruktose, Milchzucker und Maltose, geprüft, die sämtliche bei der Destillation mit Salzsäure kein Furfurol ergaben.

Für die Testbestimmungen wurde Fruktose verwendet, der kleine abgewogene Mengen von mentholglukuronsaurem Ammonium zugesetzt wurden, und nun in den Gemischen die Glukuronsäure nach der Methode von *Tanabe* bestimmt. In Tabelle 9 ist das Ergebnis von 3 Bestimmungen verzeichnet.

Tabelle 9.

Verhältnis Glukuronsäure zu Fruktose	Menge des Mentholglukuronsauren NH ₄ in mg	Glukuronsäure berechnet in mg	Glukuronsäure gefunden in mg	Fehler in %
1 : 1500	2,7	1,33	1,18	— 11
1 : 680	6,0	2,94	2,70	— 8
1 : 900	4,5	2,21	2,35	+ 6

Es ist demnach möglich, sehr kleine Mengen Glukuronsäure in Gegenwart eines großen Überschusses anderer Kohlehydrate annähernd auf etwa plus oder minus 10% genau zu bestimmen. Nachdem also die Brauchbarkeit der Methode für unsere Zwecke erwiesen war, wurde sie zur quantitativen Bestimmung der Glukuronsäure im Glykogen verwendet. Zur Untersuchung gelangte das nicht weiter gereinigte Handelspräparat der Firma *Merck*. Das Ergebnis zweier Parallelbestimmungen ist in Tabelle 10 verzeichnet.

Auf 1 g Glykogen entfallen also im Mittel etwa 3,4 mg Glukuronsäure. Wir können nun aber auch die Glukuronsäure aus den früher gefundenen Differenzen zwischen Gesamtazidität und Phosphorsäure ($c_H - n_H$) berechnen (vgl. Tabelle 8).

In Tabelle 11 ist die Berechnung für die einzelnen untersuchten Glykogensole durchgeführt. Das Molekulargewicht der Glukuronsäure beträgt 194.

Ziehen wir zum Vergleich nur die Sole A, B, C und E heran, die aus dem *Merck*-Präparat (Muschelfleisch) gewonnen wurden, so enthalten sie im Durchschnitt 2,4 mg Glukuronsäure pro 1 g Glykogen, welcher Wert größenordnungsgemäß mit der direkten quantitativen Bestimmung (Mittelwert etwa 3,4 mg) in relativ guter Übereinstimmung ist. Die Werte für die konzentrierteren Sole L₁, L₂, L₃ und M, welche Glykogen aus Leber bzw. Muskeln aus Meerschweinchen und Kaninchen enthalten, sind niedriger, durchschnittlich etwa 1,4 mg pro Gramm Glykogen. Inwieweit hier tatsächlich ein Unterschied zwischen Glykogen verschiedener Herkunft vorliegt, müßte noch näher untersucht werden.

Tabelle 10.

Glykogenmenge in g	Glukuronsäure in mg	mg Glukuronsäure pro 1 g Glykogen
1,1	4,3	3,9
2,5	7,2	2,9

 Tabelle 11. Glukuronsäuregehalt verschiedener Sole, berechnet aus der Differenz ($c_H - n_H$).

Sol	g Glykogen im Liter	$c_H - n_H \cdot 10^{-4}$	g Glukuronsäure im Liter $\cdot 10^{-2}$	mg Glukuronsäure pro g Glykogen
A	16,9	1,87	3,63	2,15
B	12,0	1,56	3,03	2,53
C	15,0	1,63	3,15	2,11
E	10,6	1,50	2,91	2,74
L ₁	36,3	3,22	5,90	1,62
L ₁₂	40,0	2,81	5,44	1,35
L ₂	42,0	2,35	4,56	1,09
L ₃	31,1	2,00	3,88	1,25
M	18,6	1,71	3,31	1,78

Aus diesen Daten läßt sich schätzungsweise die Zahl der Uronsäureester im Glykogenmolekül berechnen. Die Molarität der Monosereste pro Gramm Glykogen beträgt $1/162 = 0,00617$, der durchschnittliche Gehalt an Glukuronsäure $2,4 \cdot 10^{-3}$ pro Gramm Glykogen, die Molarität also $1,24 \cdot 10^{-5}$. Es entfallen daher auf einen Glukuronsäurerest $0,00617 : 0,0000124 = 500$ Monosereste. Entsprechend dem durchschnittlichen Phosphorgehalt von 0,0147% beträgt die Molarität der Phosphorsäure $4,74 \cdot 10^{-5}$. Es entfällt daher ein Phosphorsäurerest auf $0,00617 : 0,0000574 = 130$ Monosereste.

Nimmt man das mittlere Molekulargewicht von *Samec* an, so entfallen auf ein Molekül Glykogen etwa 1 bis 2 Glukuronsäuregruppen; bei dem wesentlich höheren Molekulargewicht von *Oakley* und *Young*

und *K. H. Meyer* würden durchschnittlich 20 bis 70 Uronsäurereste einem Glykogenmolekül zukommen.

Vergleicht man den Glukuronsäuregehalt des Glykogens mit dem anderer in dieser Hinsicht untersuchten Kohlehydrate, so ist er sehr niedrig. So finden *E. Schmidt*²¹ bei Buchenholzcellulose auf 100 Monosere-
reste, *Pauli* und *Szper* bei löslicher Stärke auf 4 bis 5, bei Dextrinen auf etwa 20 Monosere-
reste je eine Uronsäuregruppe.

Viskosimetrisches Verhalten des gereinigten Glykogens.

Zum Abschluß mögen noch die Ergebnisse einiger Untersuchungen über die innere Reibung der gereinigten Sole mitgeteilt werden. Nach *Staudinger*¹⁵ ist das Glykogen ein typisches Beispiel für ein Sphäro-
kolloid, also ein Kolloid mit kugelförmigen Teilchen. Für Lösungen solcher Kolloide gilt die Beziehung:

$$\frac{\eta_{\text{spez.}} \cdot s}{c} = K$$

wobei $\eta_{\text{spez.}}$ die spezifische Viskosität (= relative Viskosität — 1), c die Konzentration in Gramm pro Liter und s das spezifische Gewicht des Gelösten (bei Glykogen ist $s = 1,55$) bedeutet. Die Konstante K beträgt bei nicht solvatisierten Kolloiden unabhängig von der sonstigen Beschaffenheit der Teilchen und der Konzentration 0,0025. Bei solvati-
sierten Kolloiden ist K größer und das Verhältnis zur theoretischen Konstante K kann als Maß der Volumbeanspruchung dienen. Bei hohen Konzentrationen freilich ist K nicht mehr konstant, sondern nimmt beträchtlich zu. Bei Solen, deren Teilchen nicht kugelförmig sind, ist

Tabelle 12. Viskosität von Glykogensolen.

Sol	c	$\eta_{\text{rel.}}$	$\frac{\eta_{\text{spez.}}}{C}$	$\frac{\eta_{\text{spez.}}}{C} \cdot s = K$
G	5,7	1,0572	0,0103	0,0159
	11,5	1,1108	0,0097	0,0151
	22,8	1,2174	0,0095	0,0148
H	6,23	1,0659	0,0106	0,0164
	12,45	1,1268	0,0102	0,0158
	24,90	1,2558	0,0103	0,0159
L	20,05	1,2056	0,0103	0,0159
	40,10	1,5870	0,0146	0,0227
Nach <i>Staudinger</i> , für Glykogen gelöst in 0,1 n CaCl_2	10	—	0,0080	0,013
	20	—	0,0082	0,013
	30	—	0,0087	0,014
	50	—	0,0098	0,016
	100	—	0,0144	0,023

der Wert von K auch in niederen Konzentrationen nicht konstant, sondern nimmt mit der Konzentration von vornherein zu.

Es wurde die relative Reibung einiger elektrolysierten Sole bei verschiedenen Verdünnungen im *Ostwald'schen* Viskosimeter gemessen und der Wert K berechnet. In der Tabelle 12 sind die gewonnenen Ergebnisse verzeichnet und zum Vergleich ist auch eine Messungsreihe *Staudingers* an einer Glykogenlösung in $1/10$ n Calciumchloridlösung wiedergegeben.

Wie Tabelle 12 zeigt, ist der Wert K bis zu etwa 2,5% Lösungen konstant und beträgt abgerundet 0,016. Bei höheren Konzentrationen (vgl. Sol L) nimmt er aber rasch zu und beträgt für eine 4%ige Lösung 0,023. Vergleicht man damit die Werte von *Staudinger*, so liegt der Wert für K im Bereiche der niedrigeren Konzentrationen bis etwa 3% etwas tiefer und nimmt auch mit Anstieg der Konzentration langsam zu. Erst die 10%ige Lösung hat den gleichen Wert wie in unserem Fall die 4%. Das spricht für eine stärkere Solvatation der elektrolysierten Sole. Ihr K -Wert ist mehr als das 6fache jener der *Staudingerschen* Sole und etwa das 5fache der theoretischen Konstante 0,0026.

Im Gegensatz hierzu haben *K. H. Meyer* und *R. Jeanloz*²³ bei azetylierten Glykogenlösungen im Bereich von 1 bis 4% keine Konstanz, sondern wachsende K -Werte gefunden und schließen daraus, daß keine vollkommene Kugelgestalt der Glykogenmoleküle vorliegt.

Um die Temperaturbeständigkeit der Glykogenlösungen zu prüfen, wurde auch die Viskositätsänderung der Sole bei Erwärmen und nachfolgender Abkühlung im Bereich von 20 bis 90° C untersucht. Die Messungen wurden in einem *Höpplerschen* Viskosimeter durchgeführt und sind in Abb. 3 dargestellt. Die Werte sind auf beiden Wegen identisch. Erwärms- und Abkühlungskurve decken sich völlig, irreversible Änderungen der Hydratation oder andere Faktoren, die die Viskosität beeinflussen, treten innerhalb dieses Temperaturbereiches nicht ein.

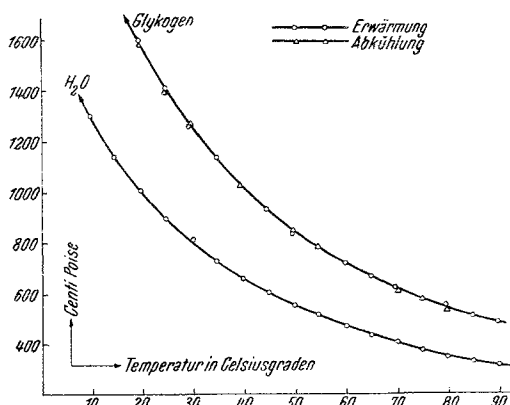


Abb. 3.

²³ *K. H. Meyer* und *R. Jeanloz*, *Helv. chim. Acta* **26**, 1788 (1943).

Damit steht auch das Verhalten des elektrischen Leitvermögens in diesem Temperaturbereich im Einklang. Das Leitvermögen ändert sich streng linear (Temperaturkoeffizient 2% pro Grad) und ist bei Rückkehr zur Ausgangstemperatur unverändert geblieben. Es findet also keine nachweisbare Abspaltung der veresterten Phosphorsäure statt, die sich sonst in einer irreversiblen Erhöhung der Leitfähigkeit kundgeben müßte. Eine solche Erhöhung haben *Pauli* und *Palmrich*¹ bei Agar-solen festgestellt, welche beim Erwärmen oder sogar bei längerem Stehen die im Agar veresterte Schwefelsäure abspalten. Eine merkliche Abspaltung der Phosphorsäure erfolgt in Glykogenlösungen, wie früher schon erwähnt, erst bei Temperaturen über 140° C.

Zusammenfassung.

1. Glykogene verschiedener Herkunft (Muscheln, Leber und Muskel von Kaninchen und Meerschweinchen) und Darstellung wurden durch Elektrodialyse aschefrei gereinigt. Der Phosphorgehalt aller dieser Glykogene ist nahezu konstant und beträgt im Mittel 0,015%.

2. Die gereinigten Glykogensole sind „azidoide“ Sole (Kolloidsäuren); sie stellen Lösungen eines Glykogenphosphorsäureesters dar.

3. Die durch konduktometrische Titration mit Barytlaug bestimmte Gesamtazidität ist größer als dem Phosphorsäuregehalt entsprechen würde. Es sind neben der Phosphorsäure demnach noch andere saure Gruppen anwesend.

4. Die Anwesenheit von Glukuronsäure wurde qualitativ durch die Naphthoresorcinprobe nach *Tollens* nachgewiesen.

5. Es wurde auch versucht, nach der von *Tanabe* angegebenen Methode die Glukuronsäure quantitativ zu bestimmen. Die erhaltenen Resultate stimmen relativ gut mit der aus den elektrochemischen Daten errechneten Mengen überein.

6. Darnach entfallen im Glykogen auf etwa 500 Monosereste eine Uronsäuregruppe und etwa 4 Phosphorsäuregruppen.

7. Die Abhängigkeit der Viskosität der gereinigten Sole von Konzentration und Temperatur wurde untersucht.