

geraden Hals des Kolbens stand eine spindelförmige, gerade anliegende, federnde Drahtspirale aus dünnem Messingdraht, deren engste Stelle etwa in der Mitte des Kolbens war. Sie diente zum Auffangen eines kurzen Reagensglases mit der genau abgewogenen Menge sorgfältig gereinigten Ameisensäure-esters, das zunächst mit der Mündung an einen passenden Korkstopfen mit Wachs geklebt wurde. Bis zum gleichmäßigen Sieden der Äthylat-Lösung bleibt der Kolben mit einem andern Stopfen verschlossen. Dann wird der Stopfen gewechselt. In der Regel werden nun im Maßzylinder einige Gasblasen aufsteigen. Der Ausgleich ist aber längst erfolgt, ehe die Befestigung des Reagensglases abschmilzt, das Glas von der Drahtspirale aufgefangen wird, und nun der Ester allmählich verdampft und durch Rückfluß aus dem Kühler in die Flüssigkeit gelangt. Hier wird er dann zum Teil verseift, zum andern Teil zu Kohlenoxyd zersetzt.

Angewandt wurden 100 g Alkohol, 5 g Na, 7.1140 g Ester. Aufgefangen wurden 480 ccm Kohlenoxyd (red. Vol.). Von 500 ccm (Zimmer-Temperatur) aus ameisensäure-ester-haltiger Lösung gleicher Konzentration entwickeltem Kohlenoxyd wurden nach besonderen Versuchen¹²⁾ durchschnittlich 0.199 g Ester mitgeführt. Der verwendete Ester selbst enthielt 0.0215 g Wasser. Unter Berücksichtigung dieser Korrekturen wurden gefunden: 1.275 g Wasser, ber. 1.2500 g. Bei größeren Wasser-Mengen als 2—3 % würden die anzuwendenden Ester- und Natrium-Mengen zu groß werden. Man müßte also auch hier eine kleinere Menge des zu untersuchenden Alkohols mit absol. Alkohol von bekanntem Wasser-Gehalt entsprechend verdünnen.

424. Endre Berner: Die vermeintliche Depolymerisation des Glykogens.

[Aus d. Institut für Organ. Chemie, Norges Tekniske Høiskole, Trondhjem.]
(Eingegangen am 29. September 1930.)

Im Juni-Hefte dieser Berichte¹⁾ habe ich gezeigt, daß die von H. Vogel und A. Pictet²⁾, sowie von H. Pringsheim, J. Reilly und P. P. Donovan³⁾ beschriebene Depolymerisation des Inulins nicht stattfindet, und daß man die beobachteten Phänomene völlig als einen physikalisch-chemischen Vorgang erklären kann. Das Inulin adsorbiert nämlich begierig Stoffe wie Alkohol, Glycerin, Glykol und Acetamid und wird dadurch leicht löslich in kaltem Wasser. Durch Analyse der vermuteten Depolymerisate wurde gezeigt, daß die adsorbierten Stoffe zusammen mit reinem Inulin quantitativ den beobachteten, verhältnismäßig großen Gefrierpunkts-Depressionen entsprachen.

In einer später erschienenen Abhandlung haben nun J. Reilly, H. Pringsheim und P. P. Donovan⁴⁾ Versuche mit Glykogen beschrieben, deren Deutung sie auf das Eintreten einer Depolymerisation dieses Kohlenhydrats zurückführen. Sie haben gefunden, daß Glykogen, in Acetamid gelöst, Gefrierpunkts-Depressionen hervorbringt, die mit Molekulargrößen nach unten bis zu $1 \times C_6H_{10}O_5$ übereinstimmen. Durch Fällen solcher Lösungen oder Lösungen des Glykogens in Formamid mit absol. Alkohol erhielten sie Präparate, die bei kryoskopischen Messungen in Wasser sofort nach der Darstellung niedrige Molekulargewichte zeigten. Durch Liegenlassen solcher Präparate an der Luft nahm die in Wasser hervorgerufene

¹²⁾ Absorption des Ester-Dampfes in 2 Waschflaschen mit amylalkohol. Natriumhydroxyd-Lösung. B. 60, 272 [1927].

¹⁾ B. 63, 1356 [1930].

²⁾ Helv. chim. Acta 11, 215 [1928]; B. 62, 2980 [1929].

³⁾ B. 62, 2378 [1929].

⁴⁾ B. 63, 1093 [1930].

Gefrierpunkts-Depression ab, was die genannten Forscher als Folge einer Reassoziatio~~n~~ der Depolymerisate deuten.

Ich habe einige ihrer Versuche wiederholt und gefunden, daß auch in diesem Fall die Deutung der Phänomene als eine Depolymerisation des Kohlenhydrates auf einem Irrtum beruht. Wird gut getrocknetes Glykogen in wasser-freien Lösungsmitteln, wie geschmolzenes Acetamid, Formamid oder Glykol, gelöst und dann durch absol. Alkohol ausgefällt, so adsorbiert es reichliche Mengen dieser Stoffe. Die Adsorption erfolgt auch in diesem Fall am besten, wenn das Wasser möglichst entfernt wird, z. B. wenn man die Glykogen-Lösung vor dem Fäll~~e~~n einige Zeit im Vakuum erhitzt. Die Menge des Amids, die adsorbiert wird, ist auch abhängig von der Menge des Alkohols, welche zur Fällung benutzt wird — je mehr Alkohol, desto weniger Amid wird adsorbiert. Die ausgefällten Präparate geben beim Trocknen im Vakuum-Exsiccator über Calciumchlorid nur langsam den Alkohol ab. Beim Liegen an der Luft dagegen zeigt es sich, daß die Alkohol-Menge rascher abnimmt, was auf die Luft-Feuchtigkeit zurückzuführen ist, die von den hygroskopischen Präparaten aufgenommen wird und dadurch die Adsorption des Alkohols aufhebt. Dieses Verhalten erklärt daher auch, weshalb das Wasser zuerst entfernt werden muß, wenn eine gute Adsorption erzielt werden soll. Bei kryoskopischen Messungen an wäßrigen Lösungen der ausgefällten Glykogen-Präparate habe ich, wie Reilly, Pringsheim und Donovan, Gefrierpunkts-Depressionen gefunden, die niedrige Molekulargewichte von einigen Hundert vortäuschen. Die Analysen der Präparate ergaben aber Gehalte an Amid und Alkohol, die die beobachteten Depressionen erklären. Z. B. erhielt ich durch Lösen von Glykogen bei gewöhnlicher Temperatur in Formamid, Fäll~~e~~n mit absol. Alkohol, Waschen mit absol. Alkohol und 2-tägiges Trocknen im Vakuum über Calciumchlorid ein Präparat mit einem scheinbaren Molekulargewicht von 342. Das Präparat enthielt dann 9.16% Alkohol und 0.25% Formamid. Nach mehrstündigem Stehen an der Luft war das scheinbare Molekulargewicht auf 610 und noch ein paar Stunden später auf 960 gestiegen. Das Präparat enthielt nunmehr nur 2% Alkohol.

In einem anderen Fall wurde eine Lösung von 5 g Glykogen in 100 g Formamid 1 Stde. im Vakuum auf 90–95° erhitzt. Durch Fäll~~e~~n und Waschen, wie vorher beschrieben, und 1-tägiges Trocknen im Vakuum-Exsiccator über Calciumchlorid wurde ein Präparat erhalten, das ein scheinbares Molekulargewicht von 255 besaß. Nach weiterem 1-tägigem Trocknen veränderte sich die Gefrierpunkts-Depression in Wasser nicht. Das Präparat wurde nun 2 Tage an der Luft stehen gelassen, dann wieder 1 Tag getrocknet. Es zeigte nun eine Depression, der ein scheinbares Molekulargewicht von 317 entsprach. Die Analyse ergab einen Gehalt von 4.13% Alkohol und 6.27% Formamid. Eine wäßrige Lösung, bereitet durch Auflösen der bei der Analyse gefundenen Mengen von Glykogen, Alkohol und Formamid, ergab eine Depression, der das scheinbare Molekulargewicht 364 entsprach.

Ich habe auch Glykol als Lösungsmittel für Glykogen benutzt und erhielt durch Fäll~~e~~n einer solchen Lösung mit absol. Alkohol ein Präparat, das nach 2-tägigem Trocknen eine große Gefrierpunkts-Depression hervorrief. Die Tatsache, daß diese, von Reilly, Pringsheim und Donovan als Glykogen~~e~~s bezeichneten, verunreinigten Glykogen-Präparate, in

Wasser gelöst, dieselbe Opaleszenz wie reine Glykogen-Lösungen besitzen und von Jod in derselben Weise gefärbt werden, steht in voller Übereinstimmung mit meiner Auffassung, daß keine Depolymerisation stattfindet.

Das für meine Untersuchungen benutzte Glykogen wurde im hiesigen Institut aus Kalbsleber gewonnen. Nach sorgfältiger Reinigung — zuletzt durch Elektro-dialyse — und Trocknen stellt das Glykogen ein lockeres Pulver von der Zusammensetzung $C_6H_{10}O_5$ dar. Der Aschen-Gehalt war weniger als 0.02%. In Wasser gelöst, zeigte es die Drehung $+194.5^\circ$. Durch kryoskopische Messungen von Glykogen in Wasser wurden Depressionen gefunden, die umso kleiner waren, je besser das Glykogen vorher getrocknet war. Dies deutet auf einen Gehalt des Glykogens an Alkohol, der also ähnlich wie bei Inulin schwer zu entfernen ist. Auch die Entfernung des Wassers bietet Schwierigkeiten — erst das Erhitzen auf $100-110^\circ$ im Vakuum liefert ein Glykogen von der Zusammensetzung $C_6H_{10}O_5$. Es ist daher erklärlich, daß Reilly, Pringsheim und Donovan bei Verwendung ihres Glykogens, das bei 80° getrocknet war, zu große Gefrierpunkts-Depressionen in Acetamid fanden.

Nachdem ich nun sowohl für Inulin wie für Glykogen gezeigt habe, daß sich die Phänomene, die von verschiedenen Forschern als Depolymerisation gedeutet sind, in einfacher Weise durch die Anwesenheit von Fremdstoffen erklären lassen, liegt es nahe anzunehmen, daß auch die für andere Kohlenhydrate, wie Lichenin und Stärke, beschriebene Depolymerisation in derselben Weise erklärt werden kann. Ich beabsichtige daher, zunächst Lichenin und Stärke in ähnlicher Weise zu untersuchen.

Beschreibung der Versuche.

Darstellung und Reinigung des Glykogens.

Das Glykogen wurde aus Leber von Mastkälbern nach der Methode von Pflüger⁵⁾ gewonnen. Das rohe Glykogen wurde in Wasser gelöst, zur Bindung des Alkalis mit etwas Salzsäure versetzt, die Lösung filtriert, der kleine Überschuß an Salzsäure mit Kalilauge neutralisiert und das Glykogen mit Alkohol ausgefällt. Das Glykogen wurde noch ein paarmal in Wasser gelöst und mit Alkohol gefällt. Es enthielt dann 1.2% Asche. Die weitere Reinigung geschah mittels Elektro-dialyse nach der Vorschrift von W. N. Haworth, E. L. Hirst und I. I. Webb⁶⁾. Es ist dabei zu bemerken, daß die Entfernung der Aschen-Bestandteile durch Elektro-dialyse bei Verwendung von recht dünnem Pergamentpapier sehr glatt vor sich geht. Sogelang es, bei 220 Volt in 1 Stde. den Aschen-Gehalt auf 0.017% herunterzubringen (0.1730 g Subst. gaben 0.030 mg Asche). Nach der Elektro-dialyse wurde das Glykogen gabeln mit Alkohol ausgefällt und das Wasser durch mehrmalige Erneuerung des Alkohols verdrängt. Das Glykogen wurde abfiltriert, auf dem Filter mehrmals mit Alkohol gewaschen und dann 2 Stdn. im Vakuum bei 78° getrocknet (Präp. 706b). Durch weiteres 2-stdg. Trocknen im Vakuum bei 100° verlor dieses Präparat 3.7% an Gewicht (Präp. 706c).

0.1314 g des Präparats 706c: 0.2132 g CO_2 , 0.0740 g H_2O .

$C_6H_{10}O_5$. Ber. C 44.42, H 6.22. Gef. C 44.25, H 6.30.

⁵⁾ Abderhaldens Handbuch der biochemischen Arbeitsmethoden, Bd. II, S. 163.

⁶⁾ Journ. chem. Soc. London 1929, 2483.

Als Mittel von 2 Bestimmungen wurde für das Drehungsvermögen folgender Wert erhalten: $[\alpha]_D^{20} = +194.5^\circ$.

Das bei 78° im Vakuum getrocknete Präparat zeigte in Wasser die folgende Gefrierpunkts-Depression: 0.208 g Glykogen in 20 g Wasser: $\Delta = 0.0075^\circ$.

Nachdem das Präparat zuerst 2 Stdn. bei 100° und dann 2 Stdn. bei 111° im Vakuum getrocknet war, wurde folgender Wert erhalten: 0.211 g in 20 g Wasser: $\Delta = 0.0045^\circ$.

Glykogen und Formamid bei gewöhnlicher Temperatur.

2.5 g zuerst bei 78° und dann 2 Stdn. bei 100° im Vakuum getrocknetes Glykogen wurden in 100 g Formamid, das vorher 1 Stde. im Vakuum auf $90-95^\circ$ erhitzt worden war, gelöst. Nach 2-stdg. Stehen bei gewöhnlicher Temperatur wurde die Lösung unter gutem Rühren in 500 ccm absol. Alkohol gegossen. Der Niederschlag wurde auf der Nutsche filtriert, mehrmals mit absol. Alkohol gewaschen und dann 2 Tage im Vakuum-Exsiccator über frischem Calciumchlorid getrocknet. Gewicht 2.55 g.

0.176 g Sbst., in 20 g Wasser gelöst, gaben eine Gefrierpunkts-Depression von 0.049° . — Das scheinbare Molekulargewicht ist folglich 342.

Die Analyse des Präparats wurde in der folgenden Weise durchgeführt: 2.0 g Sbst. wurden in 50 ccm Wasser gelöst, 3 ccm 2-n. Schwefelsäure zugesetzt und 25 ccm überdestilliert. Beim Destillieren ohne Zusatz von Säure geht ein wenig Ammoniak über, da das Formamid schon von dem kochenden Wasser etwas hydrolysiert wird. Das Destillat enthielt daher außer Alkohol Ameisensäure und mußte nach Zusatz von Lauge noch einmal destilliert werden. Im Destillat (25 ccm) wurde nun der Alkohol mittels der Jodoform-Probe nachgewiesen und seine Menge durch Bestimmung des spezif. Gewichtes ermittelt: $d_4^{20} = 0.99685$. Das Destillat enthielt folglich 7.33 g Alkohol pro Liter oder in 25 ccm 0.1833 g. Der Alkohol-Gehalt des Glykogen-Präparates ist also 9.16%. Im Rückstand von der ersten Destillation wurde nun Ammoniak durch Destillation mit Natronlauge bestimmt. Verbrauch 1.10 ccm n_{10} -HCl. Dies entspricht einer Menge von 0.00495 g Formamid oder 0.25% des Glykogen-Präparates.

Wenn dieses Präparat, das also nach 2-tägigem Trocknen im Vakuum-Exsiccator über Calciumchlorid noch 9.16% Alkohol enthielt, an der Luft aufbewahrt wurde, verlor es den Alkohol sehr rasch.

Nach 3 Stdn. fand ich: 0.193 g Sbst. in 20 g Wasser: $\Delta = 0.030^\circ$, und nach weiteren 2 Stdn.: 0.172 g Sbst. in 20 g Wasser: $\Delta = 0.017^\circ$. — Das scheinbare Molekulargewicht ist 610, bzw. 960. Wegen Substanzmangel konnte nur die mittlere Alkohol-Menge nach 3- und 5-stdg. Stehen bestimmt werden, indem die beiden zu den kryoskopischen Messungen benutzten Lösungen zusammen destilliert wurden. Es ergab sich ein Gehalt des Glykogen-Präparates an 2.3% Alkohol.

Erhitzen des Glykogens mit Formamid im Vakuum.

5.0 g Glykogen, in 100 g Formamid gelöst, wurden 1 Stde. im Vakuum auf $90-95^\circ$ erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde die Lösung unter gutem Rühren in 500 ccm absol. Alkohol gegossen, der Niederschlag dann durch mehrmaliges Dekantieren und Zusatz von absol. Alkohol gereinigt, zuletzt auf der Nutsche mit absol. Alkohol und wasser-freiem Äther gewaschen. Nach 16-stdg. Trocknen im Vakuum-Exsiccator über Calciumchlorid war das Präparat 5.5 g (Präp. 710a).

0.157 g Sbst. in 20 g Wasser: $\Delta = 0.085^\circ$. — Scheinbares Molekulargewicht 255.

Nach weiterem 24-stdg. Trocknen in derselben Weise zeigte die kryoskopische Messung (Präp. 710b): 0.144 g Sbst. in 20 g Wasser: $\Delta = 0.054^\circ$. — Scheinbares Molekulargewicht 253.

Das Präparat 710b wurde analysiert, wie vorher beschrieben. 2.0 g in 50 ccm Wasser gaben 25 ccm Destillat vom spezif. Gewicht $d_4^{20} = 0.99702$. Alkohol-Menge gleich 0.161 g oder 8.05 %. Bei der NH_3 -Destillation verbraucht: 31.1 ccm $n_{10}\text{-HCl}$, was 0.140 g oder 7.0 % Formamid entspricht.

Das Präparat 710b wurde nun 2 Tage an der Luft belassen und wieder 1 Tag im Vakuum-Exsiccator getrocknet (710c): 0.170 g Sbst. in 20 g Wasser: $\Delta = 0.051^\circ$. — Scheinbares Molekulargewicht 317.

Analyse: 2.0 g Sbst. in 50 ccm Wasser. 25 ccm Destillat mit $d_4^{20} = 0.99761$. Bei der NH_3 -Destillation verbraucht: 27.4 ccm $n_{10}\text{-HCl}$. Das Präparat 710c enthielt folglich: 4.13 % Alkohol und 6.27 % Formamid, oder in 0.170 g (der für die kryoskopische Messung benutzten Menge): 0.0070 g Alkohol und 0.01065 g Formamid. Eine Lösung, bereitet durch Lösen von 0.1523 g Glykogen, 0.0070 g Alkohol und 0.01065 g Formamid in 20 g Wasser, zeigte die Gefrierpunkts-Depression $\Delta = 0.0445^\circ$. — Scheinbares Molekulargewicht 364.

Das Präparat wurde jetzt in einem Exsiccator über konz. Schwefelsäure aufbewahrt. Nach 10 Tagen gab die kryoskopische Messung folgendes Resultat: 0.196 g Sbst. in 20 g Wasser: $\Delta = 0.036^\circ$. — Scheinbares Molekulargewicht 518.

Die Analyse ergab einen Gehalt von 6.0 % Formamid. Die Alkohol-Menge war sehr gering und wurde nur qualitativ nachgewiesen.

Nach 2-stdg. Erhitzen dieses Präparats im Vakuum bei 100° zeigte es folgende Depression: 0.1504 g Sbst. in 20 g Wasser: $\Delta = 0.0145^\circ$. — $M = 985$. Die Analyse ergab 2.9 % Formamid.

0.1890 g Sbst. in 49.80 g Lösung zeigten im 9.47-cm-Rohr ($d_4^{20} = 1.000$):

$$[\alpha]_D^{20} = (0.67^\circ \times 49.80) : (0.947 \times 0.189) = +186.5^\circ.$$

Wird die Drehung auf formamid-freie Substanz umgerechnet, so ergibt sich $[\alpha]_D^{20} = +192^\circ$.

Glykogen mit Glykol.

1.0 g Glykogen in 20 g Glykol wurde $\frac{1}{2}$ Stde. auf $90\text{--}95^\circ$ im Vakuum erhitzt. Ausfällen und Waschen mit absol. Alkohol, wie vorher beschrieben.

Nach 2-tägigem Trocknen im Vakuum-Exsiccator über Calciumchlorid: 0.164 g Sbst. in 20 g Wasser: $\Delta = 0.0445^\circ$. — Scheinbares Molekulargewicht 351.

0.66 g Sbst. in 50 ccm Wasser gaben 25 ccm Destillat vom spezif. Gewicht $d_4^{20} = 0.99776$.

Das Präparat enthielt daher 9.4 % Alkohol, welcher auch qualitativ mittels der Jodoform-Probe nachgewiesen wurde.