

Ueber ein Verfahren zum Enteiweissen des Blutes für die Zuckerbestimmung.

Von

Dr. M. Abeles.

(Aus dem Laboratorium für angew. medicin. Chemie in Wien.)
(Der Redaction zugegangen am 21. April 1891.)

Bei den Untersuchungen über den Zuckergehalt des Blutes hat man sich seither zum Enteiweissen des letzteren verschiedener Methoden bedient. Neben dem auch von Seegen geübten Schmidt-Mühlheim'schen Verfahren mit Natriumacetat und Eisenchlorid ist noch die alte Methode von Claude Bernard vielfach in Gebrauch, die im Erhitzen des Blutes in einer mit Essigsäure angesäuerten Glaubersalzlösung besteht. Statt Natriumsulfat nimmt man wohl auch Kochsalz oder coagulirt einfach durch Eingiessen in mit Essigsäure angesäuertes Wasser und Aufkochen.

Es liegen aus jüngster Zeit einige Arbeiten vor, die sich mit der Brauchbarkeit der genannten Methode beschäftigen. Barral¹⁾ gibt an, dass die Fällung mit Natriumsulfat gute Resultate gebe, nur müsse man, wenn es sich um den Zuckergehalt des lebenden Blutes handle, das Blut direct aus dem Blutgefässe des Thieres in siedende Salzlösung rinnen lassen und nicht, wie Cl. Bernard gethan, erst mischen und dann erhitzen, weil sonst das «glycolytische Ferment» (Lepine) Zeit habe, seine Wirkung geltend zu machen, und man somit zu wenig Zucker erhalte.

¹⁾ Sur le sucre du sang, son dosage etc. Paris, Bailliére, 1890.

Fritz Schenk¹⁾ hat defebrinirtem Blute gewogene Zuckermengen zugesetzt, dann das Blut in mit Essigsäure angesäuertes siedendes Wasser gegossen und im eingeeengten Filtrat den Zucker mit Knapp'scher Lösung titirt. Die gefundenen Zuckermengen blieben stets bedeutend hinter den zugesetzten zurück, es ergaben sich Verluste bis zu 80%. Durch nachträgliches Aufkochen des Coagulums mit verdünnter Salzsäure liess sich noch Zucker extrahiren, wodurch die Verluste bis auf 3% herabgedrückt wurden und sich in einem Falle sogar ein kleines Plus ergab. Fr. Schenk schloss aus seinen Analysen, dass der zugesetzte Zucker zum Theil mit einem Eiweisskörper eine Verbindung eingehe, die erst durch Kochen mit Salzsäure wieder gesprengt werde.

In einer zweiten Arbeit widerruft Fr. Schenk²⁾ diese Ansicht, nachdem er im Blute, das er mit Kaliumquecksilberjodid und Salzsäure enteiwisst, den zugesetzten Zucker nahezu wieder gefunden und ausserdem sich auf indirectem Wege, nämlich durch Dialysiren von Eiweisslösungen mit oder ohne Zuckerzusatz gegen Wasser oder Zuckerlösungen und Untersuchung der Dialysate überzeugte, dass die supponirte Verbindung nicht bestehe.

Die Angaben Fr. Schenk's in seiner ersten Publication veranlassten Röhmann³⁾, der sich seit Langem mit Untersuchungen des Zuckergehaltes von Blut und Lymphe befasst, nochmals die von ihm geübte Methode, nämlich Coaguliren des Blutes mit angesäuertem Glaubersalzlösung auf ihre Genauigkeit zu prüfen. In 4 Versuchsreihen, welche mit defebrinirtem Rinds- und Hundeblood, sowie mit Carotisblut vom Hunde angestellt wurden, bestätigt Röhmann, dass von dem dem Blute zugesetzten Zucker ein beträchtlicher Theil verloren gehe, wenn auch lange nicht so viel als bei Fr. Schenk. Es ergaben sich Verluste von 3,6% bis 24%, wobei jedoch der

¹⁾ Ueber d. Verhalten des Traubenzuckers zu den Eiweisskörpern des Blutes, Pflüger's Archiv, Bd. 46.

²⁾ Pflüger's Archiv, Bd. 47.

³⁾ Ueber d. Bestimmung d. Zuckers im Blute, Centralbl. f. Phys., Bd. 4, No. 1.

natürliche Zuckergehalt des verwendeten Blutes, der allerdings stets unter 0,05 in 50 ccm. betrug, nicht mit berücksichtigt ist. Die im Vergleiche zu Fr. Schenk auffallend besseren Resultate erklärt Röhmann daraus, dass er die Coagula gründlicher auswasche. Er meint, dass die Methode trotz aller Fehlerquellen für vergleichende Analysen ganz brauchbar sei.

Seegen¹⁾ weist an der Hand seiner ungemein zahlreichen Einzelversuche, die er im Laufe der letzten Jahre ausgeführt²⁾, nach, dass es möglich sei, viel genauere Resultate zu erzielen, als dies Röhmann gelungen. Die Analysen mit Blut aus denselben Gefässgebieten zeigen eine gute Uebereinstimmung und bei den Versuchen mit Zuckerzusatz, die Seegen anlässlich seiner Studien über den Einfluss der Respiration auf den Zuckergehalt des Blutes angestellt, fand er in 9 von 16 Fällen den ganzen Zucker wieder. Seegen bedient sich zwar der Schmidt-Mühlheim'schen Methode, überzeugte sich aber, dass man auch nach Schenk beziehungsweise Röhmann zum Ziele gelange, wenn man nur die Niederschläge gründlich auswasche.

Ich habe zwei Versuche mit Glaubersalz angestellt und mich dabei an die Vorschriften von Röhmann gehalten, nur dass ich das mit heissem Wasser ausgewaschene Coagulum auch noch auspresste. Das verwendete Blut war durch 8tägiges Stehen vollkommen zuckerfrei gemacht worden. Im ersten Versuche wurden zu 50 ccm. 0,100 Zucker zugesetzt und davon 0,096 wieder gefunden. Im zweiten Versuche wurden zu 50 ccm. 0,200 Zucker zugesetzt und davon nur 0,170 wieder gefunden. Die Verluste betragen somit 4% resp. 15%.

Ueber die Schmidt-Mühlheim'sche Methode hatte ich schon bei früheren Gelegenheiten³⁾ Erfahrung gesammelt. Auch ich halte sie für die relativ zweckmässigste unter den bislang gebräuchlichen, sie theilt aber mit diesen gewisse sehr

¹⁾ Zur Zuckerbest. d. Blutes, Centralbl. f. Physiol., Bd. 4, No. 8.

²⁾ Zuckerbildungen im Thierkörper.

³⁾ Zur Frage d. Zuckerb. i. d. Leber, Wien. med. Jahrbücher, 1887.

störende Mängel. Will man die Coagula gründlich erschöpfen, ist man genöthigt, sie wiederholt auszuwaschen und auszupressen. Man hat es dann mit einem mehrere Liter betragenden Filtrate zu thun, welches, wenn man 50 ccm. Blut in Arbeit genommen, 50 bis 70 Milligramm Zucker enthält, und wenn auch das lange Eindampfen nicht schaden mag, so ist die Manipulation mit so grossen Flüssigkeitsmengen der Genauigkeit jedenfalls nicht förderlich.

Weiters geht bei der Schmidt-Mühlheim'schen Methode die Coagulation zwar in der Regel sehr gut vor sich, es kommen aber auch nicht selten Ausnahmen vor. Ohne dass man an dem oft geübten Verfahren etwas geändert hätte, scheiden sich bisweilen die Eiweisskörper schlecht ab und die Flüssigkeit geht langsam und trüb durch's Filter. Die eingeeengten Lösungen, die man schliesslich zur Titrirung verwendet, sind meist stark gefärbt. Trotz dieser Färbung verlaufen jedoch die Titrationsen gewöhnlich gut und der Endpunkt lässt sich bestimmen. Bisweilen aber ereignet sich das Gegentheil, d. h. das ausgeschiedene Kupferoxydul setzt sich nicht ab, oder es thut dies zwar, aber die darüber stehende Flüssigkeit zeigt mehr oder weniger starke Biuret-reaction und verhindert so das richtige Erkennen des Endes der Titration.

Es mir gelungen, zur Abscheidung der Eiweisskörper aus dem Blute ein neues Verfahren ausfindig zu machen, welches bei genügender Genauigkeit leicht durchzuführen ist und mittelst dessen man solche Lösungen darstellt, in denen sich der Zucker ausnahmslos leicht und sicher maassanalytisch bestimmen lässt.

Dasselbe besteht im Wesentlichen darin, dass die Eiweisskörper des Blutes mit einer alkoholischen Lösung von Zinkacetat (oder Chlorzink) ausgefällt werden.

Im Einzelnen ist der Vorgang folgender:

Man bereitet sich vor Allem eine Lösung von Zinkacetat in absolutem Alkohol, wozu ein dem zu untersuchenden Blute gleiches Volumen von absolutem Alkohol und 5% vom Gewichte dieses Blutes an Zinkacetat verwendet werden, d. i.

also 0,05 gr. des letzteren auf 1 gr. Blut. Die dadurch entstehende trübe Flüssigkeit wird nicht filtrirt, sondern sammt dem darin suspendirten ziemlich reichlichen Niederchlage direct verwendet, da der letztere erfahrungsgemäss für die vollständige Abscheidung der Eiweisskörper von Bedeutung ist.

Nimmt man statt des absoluten Alkohols 90—95% Alkohol, so ist entsprechend mehr zu verwenden; ein Plus von Alkohol schadet nichts, wohl aber ist eine zu geringe Menge desselben ungünstig.

Will man Blut des lebenden Thieres in möglichst unverändertem Zustande untersuchen, so bringt man, wenn man, wie gewöhnlich, etwa 50 ccm. Blut verwendet, die Lösung von Zinkacetat in ein kleines Becherglas, in welchem ein für allemal ausgewerthet worden ist, bis zu welcher Höhe ein Gemenge des verwendeten Alkoholvolumens mit 50 ccm. Wasser reichen, wägt dasselbe, lässt dann das Blut aus der Arterie oder Vene des Thieres bis zur markirten Höhe einfließen und wägt wieder. Ist dabei die Höhenmarke zufällig überschritten worden, so kann man nachträglich, nachdem man gewogen, noch so viel alkoholische Zinklösung zusetzen, als dem Plus an Blut entspricht.

Das Blut wird bei dem Contacte mit dem Alkohol im ersten Augenblicke hellroth, nimmt aber schon nach wenigen Minuten eine dunkle braun- bis schwarzgraue Färbung an. Diese Farbenveränderung wird durch Umrühren mit einem Glasstabe gefördert. Die Coagulation und die Aufschliessung der Blutkörperchen ist erst dann als vollkommen anzusehen, wenn der Niederschlag eine gleichmässige schwarzgraue Masse bildet, in der sich keine rothen Blutklümpchen finden. Zum Zwecke der sicheren Zerstörung der Blutzellen habe ich anfangs das Blut auch mit Aether lackfarben gemacht, bin aber später davon abgekommen, weil kein erkennbarer Vortheil zu constatiren war.

Man filtrirt nun durch ein mit Alkohol angefeuchtetes Faltenfilter, wäscht mit 90—95% Alkohol nach, bringt den Rückstand auf ein mit Alkohol angefeuchtetes Stück Lein-

wand und presst mit der Handpresse scharf aus. Der Pressrückstand wird, so gut es geht, aus dem Papier geschält und in einer Schale mit dem Pistill zerdrückt; dann mit Alkohol zu einem feinen Schlamm zerrieben und auf ein neues Faltenfilter gebracht. Auch das abgelöste Papier wird mit den daran haftenden Resten des Coagulums in Alkohol zerrieben, dieser, sowie der durch das Auspressen gewonnene gleichfalls auf's Filter gebracht, nachgewaschen, die Masse nochmals ausgepresst und die abrinrende Flüssigkeit, wenn nöthig, filtrirt mit den früheren Filtraten vereinigt.

Die gesammten, gewöhnlich etwas trüben Flüssigkeiten enthalten überschüssiges Zink, welches man mit kohlen saurem Natron ausfällt. Man verwendet dazu zweckmässig eine concentrirte Lösung desselben (1 : 5) und setzt davon unter Umrühren so lange zu, bis deutliche alkalische Reaction nachweisbar ist. Das ausfallende kohlen saure Zink, sowie das überschüssige herausfallende kohlen saure Natron klären die Lösung. Bei dem nun folgenden Filtriren geht das Filtrat vollständig klar und beinahe immer farblos durch, trübt sich aber oft nachträglich von später sich ausscheidendem kohlen saurem Zink, was aber für den weiteren Vorgang nicht hinderlich ist. Das Filtrat, welches (bei 50 ccm. Blut) gewöhnlich 250 ccm., höchstens 300 ccm. beträgt, wird mit Essigsäure schwach angesäuert und auf 20 bis 30 ccm. eingedampft, wobei sich zum Schluss, nachdem der Alkohol verjagt ist, noch etwas Unlösliches ausscheidet, das zum Theile der Wand der Schale anhaftet, zum Theile in Form von Tropfen auf der Flüssigkeit schwimmt. Man spült nun die Flüssigkeit in einen Maasscylinder, setzt neuerdings 3—4 Tropfen einer concentrirten wässrigen Lösung von Zinkacetat oder Chlorzink zu und versetzt mit kohlen saurem Natron bis zum Eintritt alkalischer Reaction. Sodann füllt man bis auf das ursprüngliche Volumen auf und filtrirt durch ein trockenes Filter. Das Filtrat kann sofort zum Titiren verwendet werden. Es ist nur schwach gelb gefärbt, gibt mit Salzsäure und Kaliumquecksilberjodid keine Trübung und enthält nur eine Spur von kohlen saurem Zink, die sich übrigens beim Stehen von

selbst abscheidet und von der man die Lösung durch Abgiessen oder nochmaliges Filtriren durch ein kleines trockenes Filter befreien kann. Für's Titiren ist indessen die kleine Beimengung von Zink gleichgiltig, da es sich in der Lauge löst und nicht weiter stört.

Der durch den letzten Zusatz von kohlensaurem Natron entstehende Zinkniederschlag schliesst, wie ich mich überzeugt habe, keinen Zucker ein, sondern enthält davon nur so viel, als der anhaftenden Flüssigkeit entspricht. Wäscht man nämlich aus und löst den Niederschlag in Salzsäure, so erhält man mit der Fehling'schen Lösung keine Reduction mehr.

Die Methode, die nach der Beschreibung complicirt und und langwierig erscheinen mag, ist in der Praxis einfacher und schneller durchführbar als die bisher gebräuchlichen. Einigermassen zeitraubend ist das Zerreiben und neuerliche Auspressen des Blutkuchens. Es ist aber nicht rathsam, es zu unterlassen. In zwei Untersuchungen, die zu diesem Zwecke angestellt wurden, hat sich herausgestellt, dass durch das zweite Auswaschen und Auspressen circa 8% des Gesamtzuckers gewonnen werden, die sonst verloren wären. Ein drittes Auswaschen ist überflüssig. Wiederholte Untersuchungen haben gelehrt, dass bei sorgfältigem Arbeiten sich aus dem zweiten Pressrückstand weder mit Alkohol noch durch Aufkochen im Wasser eine bestimmbare Menge reducirender Substanz extrahiren lasse.

Es wurden Analysen ausgeführt mit defibrinirtem Pferdeblut und mit frischem Blute aus der Carotis vom Hunde mit und ohne Zusatz von gewogenen Zuckermengen. Ferner wurde die Methode geprüft an Blut, das entweder durch 8tägliches Stehen oder durch mehrtägige Dialyse in strömendem Wasser vollständig zuckerfrei gemacht und mit bekannten Zuckermengen versetzbar war. Es ergab sich, dass im letzten Falle, nämlich wenn zu entzuckertem Blute eine gewogene Zuckermenge zugesetzt war, derselbe nahezu ganz wiedergefunden wurde. Auch beim defibrinirten Blute sind die Verluste nicht wesentlich grösser und nur beim nativen Blute aus der Carotis

zeigen sich erhebliche Differenzen. Namentlich ist es auffallend, dass man mehr Zucker finden kann, als dem Zusatz plus dem Blutzucker entspricht. Es geht daraus hervor, dass die einzelnen aus dem Gefässe ausströmenden Portionen nicht gleichen Zuckergehalt haben, selbst wenn sie rasch nach einander aufgefangen werden. Ob diese Schwankungen durch die besonderen Bedingungen, unter denen sich das Thier während der Blutentnahme befindet, erzeugt werden oder ob sie einen physiologischen Zustand darstellen, lässt sich nicht entscheiden, doch mahnt die Thatsache neuerdings, aus kleinen Differenzen im Zuckergehalte mehrerer Blutproben keine weitgehenden Schlüsse zu ziehen.

Ueber die Grenzen der Genauigkeit gibt beifolgende Tabelle (Seite 503) eine Uebersicht.

Die Analysen wurden im Anfange mit Chlorzink, später mit essigsaurem Zink ausgeführt. Die Endresultate sind bei beiden gleich, jedoch hat essigsaures Zink mehr entfärbende Kraft, weshalb ich es vorziehe. Ich habe auch andere in Alkohol lösliche Metalle auf ihre Verwendbarkeit geprüft. Die Cadmiumsalze leisten dasselbe, wie die Zinksalze, Blei und Eisen stehen dem Zink¹⁾ nach.

Die Methode ist zunächst mit Rücksicht auf Zuckerbestimmungen ausgearbeitet, sie dürfte aber auch für andere im Blute enthaltene in Alkohol lösliche Körper, z. B. Harnstoff, zu brauchen sein. Für die Zuckerbestimmung hat sie folgende Vortheile:

1. Die alkoholische Zinklösung sistirt im Blute jeden wie immer gearteten Lebensvorgang, der auf den Zucker Einfluss haben könnte, was nach den älteren Methoden nicht, oder doch nicht in so einfacher Weise, möglich ist.

¹⁾ Die Herren E. Freund und Landsteiner haben in genanntem Laboratorium schon früher zu anderen Zwecken Zinksulfat, das sie dann mit phosphors. Natron ausfällten, zum Enteiweissen des Blutes benützt, ohne aber den Gegenstand weiter zu verfolgen.

No. des Versuchs.	Art des Blutes.	Blutmenge in Gramm.	Zugesetzter Zucker in Gramm.	Gefundener Zucker in Gramm.	Differenz in Gramm.	Differenz in Proc.	Anmerkung.
I ^a .	Defebrinirtes Pferdeblut	50	0	0,0499	—	—	—
		50	0,051	0,0987	- 0,0022	- 2,2	
I ^b .	dtto. mit Aether lackfarben gemacht	50	0	0,0493	—	—	—
		50	0,051	0,0977	- 0,0026	- 2,6	
II.	Defebrinirtes Pferdeblut	52,5	0	0,051	—	—	—
		52,7	0,240	0,275	- 0,016	- 6,6	
		54,0	0,400	0,455	+ 0,003	+ 0,7	
III.	Hundeblut aus der Carotis	54,6	0	0,070	—	—	—
		64,3	0	0,083	+ 0,003	+ 4,3	
		51,6	0	0,069	+ 0,003	+ 4,4	
IV.	dtto.	58,6	0	0,070	—	—	Zucker der alkohol. Zinklös. zuges. Zucker dem nativen Blute zuges.
		50,5	0,051	0,115	+ 0,004	+ 3	
		55,4	0,051	0,119	+ 0,006	+ 8,1	
V.	dtto.	61	0	0,061	—	—	—
		97,2	0,051	0,148	- 0,011	- 11,3	
VI.	dtto.	61	0	0,060	—	—	Zucker der alkohol. Zinklös. zuges. Zucker dem nativen Blute zuges.
		50,9	0,051	0,0111	+ 0,0097	+ 8,7	
		60,95	0,051	0,0110	- 0,0012	- 1	
VII.	Durch Dialyse entzuckertes Blut	70	0,051	0,0503	- 0,0007	- 1,3	—
		70	0,0714	0,0697	- 0,0023	- 3,2	
VIII.	Durch Stägiges Stehen entzuckertes Blut	70	0,051	0,0488	0,0022	- 4,3	—
		70	0,0714	0,0710	0,0004	- 0,5	

2. Die Enteiweissung geht in der Kälte vor sich und die resultirende Zuckerlösung wird relativ nur kurze Zeit während des Abdampfens der geringen Flüssigkeitsmenge erhitzt.
 3. Die zum Titriren verwendeten Lösungen sind klar, sehr wenig gefärbt und vollständig eiweissfrei. Die Titrationsen vollziehen sich in Folge dessen ausnahmslos ebenso leicht, als ob es sich um eine reine wässrige Zucker-Salzlösung handelt. Niemals kommt es vor, dass ein Versuch wegen Undeutlichkeit des Endpunktes ein unsicheres Resultat gäbe.
 4. Wird die Genauigkeit der Methode von keiner anderen übertroffen, sehr oft nicht erreicht. Es unterliegt keinem Zweifel, dass man auch nach den älteren Methoden oft wünschenswerthe Genauigkeit erzielen kann, sie lassen aber auch oft im Stich.
-