

# Über den Nachweis von Fruchtzucker in menschlichen Körpersäften.

Von

Dr. Rudolf Ofner.

(Aus dem chem. Laboratorium der k. k. deutschen Universität in Prag.)

(Der Redaktion zugegangen am 17. Juni 1905.)

Neuberg und Strauß<sup>1)</sup> haben zum Zwecke des Nachweises von Fruchtzucker in menschlichen Körpersäften eine Methode ausgearbeitet, welche auf dem von Neuberg<sup>2)</sup> aufgestellten Satze, daß ausschließlich nur Ketosen, nicht aber Aldosen imstande sind, mit sekundären asymmetrischen Hydrazinen Osazone zu bilden, begründet ist. Dieser Satz stimmt jedoch, wie meine Untersuchungen gezeigt haben,<sup>3)</sup> mit den Tatsachen durchaus nicht überein. Ich habe einerseits den Beweis erbracht, daß reines Benzylphenylhydrazin weder mit Fruktose noch mit Glukose ein kristallisiertes Osazon zu bilden vermag,<sup>4)</sup> andererseits ist es mir auch gelungen, das Methylphenylosazon der Glukose aus Methylphenylhydrazin und

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. XXXVI, S. 233 (1902).

<sup>2)</sup> Berl. Ber., Bd. XXXV, S. 959 u. 2626 (1902).

<sup>3)</sup> Monatsh. f. Chemie, Bd. XXV, S. 1153 (1904).

<sup>4)</sup> Das von Neuberg (l. c.) irrtümlich als Benzylphenylosazon der Fruktose beschriebene Produkt ist, wie ich zeigen konnte (Monatshefte für Chemie, Bd. XXV, S. 1153), de facto ein gemischtes Phenyl-Benzylphenylosazon, das sich auch aus der Glukose unter den gleichen Verhältnissen bildet, wenn man nämlich käufliches Benzylphenylhydrazin in Anwendung bringt, das nach meinen Untersuchungen (Monatshefte f. Chemie, Bd. XXV, S. 592) neben einer beträchtlichen Menge Benzylidenbenzylphenylhydrazon stets mehr oder weniger Phenylhydrazin enthält.

Glukose darzustellen,<sup>1)</sup> sodaß auch diesem Reagens, welches die Hauptstütze des von Neuberg aufgestellten Satzes bildet, die ihm zugeschriebene Bedeutung abgeht. Zunächst hatte es sich mir nur darum gehandelt, die Tatsache festzustellen, daß sich das mit dem Methylphenylfruktosazon identische Produkt auch aus der Glukose darstellen läßt, weshalb ich bei dieser Beweisführung die Bedingungen der für die Fruktose geltenden Vorschrift Neubergs nicht eingehalten habe. Gleichzeitig konnte ich feststellen, daß reine Fruktose unter den gleichen Umständen in viel kürzerer Zeit und in bedeutend besserer Ausbeute das Osazon zu bilden vermag als reine Glukose und daß daher die Ausscheidung der Osazonkristalle für die Gegenwart von Fruktose unbedingt beweisend ist, wenn sie sich innerhalb von höchstens 5 Stunden bei Zimmertemperatur vollzogen hat. Doch ist diese Zeitdauer der freiwilligen Abscheidung nur bei reinen Fruktoselösungen zu erreichen. Gleiche oder größere Mengen Glukose neben Fruktose verzögern die freiwillige Ausscheidung des Fruktosazons oft sehr bedeutend.

Nun ist nach der Vorschrift von Neuberg und Strauß<sup>2)</sup> die Lösung, welche auf Fruktose untersucht werden soll, nach Zusatz der entsprechenden Mengen Methylphenylhydrazin und Essigsäure bei einer Temperatur bis zu 40° durch 24 Stunden zu erwärmen. Hierbei resultiert in der Regel ein Öl, aus dem sie auf eine nicht gerade einfache Weise das Osazon isolieren. Diese Methode erweist sich aber für den Nachweis der Fruktose vollständig unbrauchbar: denn unter diesen Verhältnissen und mitunter in noch viel kürzerer Zeit geben, wie die nachstehenden Versuche lehren, auch Glukoselösungen stets das Osazon, wofern die Konzentrationsverhältnisse günstig sind. Auf letzere wird in der Vorschrift von Neuberg und Strauß keine Rücksicht genommen und gerade von der Konzentration hängt es bei diesem Verfahren ab, ob das Osazon nach der 24stündigen Reaktionsdauer in Glukoselösungen bereits gebildet oder etwa schon zersetzt ist. Doch auch aus Fruktoselösungen läßt sich bei ungünstig gewählter

---

<sup>1)</sup> l. c.

<sup>2)</sup> l. c.

Konzentration nach 24stündiger Reaktionsdauer infolge eingetretener Zersetzung kein Osazon isolieren. Wenn nun Neuberg und Strauß unter den von ihnen angegebenen Bedingungen aus Glukoselösungen kein Osazon zu erhalten vermochten, so lag dies jedenfalls an der zufällig ungünstig getroffenen Konzentration der Lösungen.

Das von diesen Forschern angewendete Verfahren zum Nachweise des Fruchtzuckers in menschlichen Körpersäften sei hier in seinen wesentlichen Zügen wiedergegeben: Die von den Eiweißstoffen und Salzen zum größten Teile befreite alkoholische Lösung wird auf ein kleines Volumen von ungefähr 30 ccm verdampft — es wird hierbei, wie schon oben erwähnt wurde, von einer Rücksichtnahme auf die Konzentration der Zuckerlösung nichts gesprochen — und mit der entsprechenden Menge Methylphenylhydrazin versetzt, einige Stunden stehen gelassen und nötigenfalls filtriert. Hierauf erfolgt der Zusatz der entsprechenden Menge 50%iger Essigsäure und von soviel Alkohol, daß eine klare Lösung entsteht. Diese wird nun 24 Stunden lang im Brutschranke auf 40° (an einem andern Orte<sup>1)</sup> heißt es bis höchstens 40°) erwärmt. Bei größerer Menge Fruchtzucker scheidet sich das Osazon direkt kristallinisch, eventuell nach Zusatz von etwas Wasser, ab. Bei geringerer Menge erhält man das Osazon auf Wasserzusatz zunächst als Öl, das bei öfterem Reiben eventuell nach Impfung fest wird. Um schneller zum Ziele zu gelangen, wird das freiwillig oder durch Wasserzusatz ausgeschiedene ölige Methylphenylosazon durch Abgießen von der Mutterlauge getrennt und nochmals durch Dekantieren mit kaltem Wasser gewaschen, hierauf im Vacuum über konzentrierter Schwefelsäure getrocknet, das resultierende Harz in absolutem Alkohol gelöst und in eine Kältemischung von fester Kohlensäure und Äther gestellt. Das ausgeschiedene Osazon wird aus stark verdünntem Pyridin umkristallisiert.

Diese Vorschrift habe ich in einer ganzen Reihe von Versuchen bei Glukoselösungen vollständig eingehalten und hierbei in den meisten Fällen beträchtliche Mengen von Osazon zu iso-

<sup>1)</sup> Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XXXVII, S. 4616.

lieren vermocht. In den Fällen, in denen ich nicht kristallinisches Osazon, sondern ölige Produkte erhielt, habe ich letztere zum Zwecke der Isolierung des Osazons zum Teile nach Vorschrift behandelt, im allgemeinen es jedoch vorgezogen, das durch Reiben festgemachte Produkt bloß mit Äther zu digerieren und das Osazon auf diese einfachere Weise zu isolieren. Das so gewonnene Produkt wurde durch Umkristallisieren in kristallinische Form übergeführt. Untersucht wurden Lösungen reiner Glukose (Tabelle A), neben denen häufig gleichzeitig Parallelversuche mit reiner Fruktose angestellt wurden (Tabelle B), ferner Gemische von Glukose und Fruktose, normaler Harn, dem in dem einen Falle Glukose, in dem andern Fruktose zugesetzt wurde, schließlich Diabetesharn, der frei von Fruktose gewesen ist.

Die Versuche, welche mit Lösungen reiner Glukose (Tabelle A) und reiner Fruktose (Tabelle B) angestellt wurden, sind der leichtern Übersicht halber in den nachstehenden Tabellen zusammengefaßt, wobei jedesmal besonders auf die Konzentration des in Wasser gelösten Zuckers Rücksicht genommen wird. Das relative Verhältnis des Zuckers zu dem angewendeten Methylphenylhydrazin und der 50%igen Essigsäure bleibt bei allen Versuchen dasselbe. Anschließend an die Tabelle erfolgt die Anführung der Beobachtungen, die sich an die einzelnen Versuche geknüpft haben.

#### Zu Tabelle A. Lösungen reiner Glukose.

I. Nach Ablauf von 24 Stunden war etwas Öl ausgeschieden. Die trübe Flüssigkeit wurde vom Öle abgegossen, mit Wasser versetzt, stark gerieben und geimpft. Nach kurzer Zeit resultierte das Osazon in Form von rotgelben Nadeln. Die Kristalle wurden nach 2 Stunden abgesaugt. Aus dem Öle selbst wurde durch Digerieren mit Äther ebenfalls etwas Osazon isoliert.

Die Versuche II und III wurden in der gleichen Weise wie I behandelt und lieferten ebenfalls beim Reiben kristallinisches Osazon, der unter III in der Tabelle angeführte 2. Versuch sogar ohne Impfung.

Tabelle A (Glukoselösungen).

Versuchs- zahl	Zucker in g	Wasser in ccm	Konzentration des Zuckers:Wasser	Alkohol in ccm	Tem- pera- tur	Stunden	Aus- beute in %			
A I	2	30	1 : 15	5	37°	24	19			
II	2	40	1 : 20	5	37°	24	20			
III	{	1,5	30	1 : 20	5	37°	24	27		
		2	35	1 : 17,5	5	37°	24	12		
IV	{	a	2	30	1 : 15	5	37°	24 Std. bei 37°, weitere 24 Std. b. Zimmertemp.	14	
		b	2	35	1 : 17,5	5	38°		40	17
			2	40	1 : 20	5	38°		40	19
V	3,6	30	1 : 8,3	5	40°	24	ca.13			
VI	3,6	30	1 : 8,3	5	37-38°	24	15			
VII	{	3,6	30	1 : 8,3	5	40°	18	9		
		3,6	30	1 : 8,3	5	40°	15	9		
VIII	3,6	20	1 : 5,5	10	40°	24	0			
IX	3,6	20	1 : 5,5	10	30°	24	17			
X	{	1,8	5	1 : 2,8	5	30°	24	6,5		
		1,8	5	1 : 2,8	12	30°	24	4,6		

Tabelle B (Fruktoselösungen).

B I	3,6	20	1 : 5,5	5	30°	24	58
II	1,8	30	1 : 16,7	12	30°	24	23
III	1,8	5	1 : 2,8	5 (12)	30°	24	0
IV	1,8	30	1 : 16,7	7	40°	24	50
V	3,6	8	1 : 2,2	8	40°	24	0

IV. Dieser Versuch ist deshalb erwähnenswert, weil sich hier das Osazon ohne weitere Behandlung freiwillig kristallinisch ausgeschieden hatte, doch war in diesem Falle die Reaktionsdauer von 24 Stunden überschritten.

In den nachfolgenden Fällen gestaltete sich die Ausbeute bereits ungünstiger, auch konnte das Osazon nicht schon durch bloßes Reiben kristallinisch erhalten werden: der Grund liegt in der Konzentration, die in allen diesen Versuchen bedeutend stärker war als in den oben angeführten.

V. Schon nach 16 Stunden war dunkles Öl ausgeschieden. Doch erst nach Verlauf von 24 Stunden wurde dasselbe gewaschen, getrocknet, das resultierende Harz nach Vorschrift in absolutem Alkohol gelöst und in ein Kältegemisch von fester Kohlensäure und Äther gestellt. Hierbei schied sich nur ein Teil des Osazons aus, während der größere aus der Mutterlauge durch Verdunsten des Alkohols und nachheriges Digerieren mit Äther isoliert wurde. Aus verdünntem Pyridin umkristallisiert, resultierten gelbbraune Nadeln vom Schmelzpunkte  $148^{\circ}$ .

VI. In diesem Versuche wurde die vom Öle abgegossene Mutterlauge mit dem Waschwasser des Öles vereinigt und lieferte nach öfterm Reiben kristallinisches Osazon. Das Öl selbst wurde nach dem Waschen getrocknet und mit Äther digeriert und ergab den übrigen Teil des Osazons.

VII. Hier wurde aus dem Öle schon nach 18stündiger, bzw. 15stündiger Reaktionsdauer das Osazon erhalten.

VIII. Bei einer Temperatur von  $40^{\circ}$  wurde bei diesem Versuche kein Osazon erhalten. Das gleiche Reaktionsgemisch lieferte jedoch bei  $30^{\circ}$  (Versuch IX) 17% Osazon. Das Öl mußte durch Wasserzusatz zur Ausscheidung gebracht werden.

X. Bei noch stärkerer Konzentration resultierte bei einer Temperatur von  $30^{\circ}$  immer noch etwas Osazon.

Die oben angeführten Versuche lassen erkennen, daß für die Darstellung des Methylphenylosazons aus der Glukose bei einer Reaktionsdauer von 24 Stunden eine Temperatur von ungefähr  $37^{\circ}$  sowie eine Konzentration, bei welcher auf 1 Teil Glukose 20 Teile Wasser entfallen, die besten Resultate erzielt wurden. Die angewendete Alkoholmenge war in allen diesen Fällen eine geringe. Bei starker Konzentration und einer Temperatur von  $40^{\circ}$  resultiert gewöhnlich ein stark zersetztes öliges Produkt, aus welchem sehr wenig oder gar kein Osazon zu gewinnen ist.

### Zu Tabelle B. Lösungen mit reiner Fruktose.

I. Bei 30° war schon nach 1 Stunde eine starke Trübung eingetreten, nach 15 Stunden war die Ausscheidung des Osazons bereits beendet.

II. In diesem Versuche war die Ausbeute bedeutend geringer; ein Parallelversuch mit einer Glukose ergab nur äußerst wenig Osazon.

III. Infolge starker Konzentration selbst bei 30° kein Osazon, während Glukose unter den gleichen Verhältnissen eine Ausbeute von 6,5% bzw. 4,6 ergeben hat.

IV. Die Ausscheidung des kristallinen Osazons war schon nach 7 Stunden beendet, nach 24 Stunden war schon teilweise Zersetzung eingetreten.

V. In dieser ziemlich stark konzentrierten Lösung war das Osazon nach 5 Stunden kristallinisch ausgeschieden. Bei weiterer Einwirkung begann es sich jedoch allmählich zu zersetzen, sodaß nach 24 stündiger Reaktionsdauer nur ein dunkles Öl vorhanden war, aus dem sich gar nichts mehr isolieren ließ. Das Öl löste sich selbst nach längerem Reiben vollständig in Äther auf.

Aus diesen Versuchen ist zu ersehen, daß die Fruktose unter günstigen Bedingungen nach 24 stündiger Reaktionsdauer eine bedeutend bessere Ausbeute liefert als die Glukose, daß sie viel schneller reagiert und besonders in stark konzentrierter Lösung schon in kurzer Zeit Osazon bildet, welches jedoch in diesem Falle nach 24 stündiger Einwirkung vollständig zersetzt ist. Unter den letzteren Verhältnissen ist somit bei Beobachtung der Vorschrift von Neuberg und Strauß selbst aus Fruktose nach 24 stündiger Erwärmung auf 40° kein Osazon zu erhalten.

### Lösungen mit Glukose neben Fruktose.

I. 1,3 g Glukose und 0,5 g Fruktose wurden in 15 ccm Wasser gelöst und nach Zusatz von 4 g Methylphenylhydrazin, 4 ccm 50%iger Essigsäure und 10 ccm Alkohol im Brutschranke auf 40° durch 24 Stunden erwärmt. Das ausgeschiedene Öl wurde mit Wasser dekantiert, geimpft, im Vacuum

über konzentrierter Schwefelsäure getrocknet, in absolutem Alkohol gelöst und in ein Kältegemisch von fester Kohlensäure und Äther gestellt. Es konnte das Osazon nicht isoliert werden.

II. 1,8 g Glukose und 1,8 g Fruktose wurden in 20 ccm Wasser (1:5,5) gelöst, mit den molekularen Mengen Methylphenylhydrazin und Essigsäure und mit 13 ccm Alkohol versetzt. Aus dem dunklen Öle, welches nach 24 stündiger Reaktionsdauer bei 40° erhalten wurde, ließ sich nicht einmal eine geringe Menge Osazon isolieren.

III. Aus einer Mischung, welche 0,9 g Glukose und 0,9 g Fruktose, gelöst in 10 ccm Wasser, neben der molekularen Menge von Methylphenylhydrazin und 50%iger Essigsäure enthielt, hat sich bei Zimmertemperatur erst nach 15 Stunden kristallisiertes Osazon freiwillig ausgeschieden, während das bei Abwesenheit von Glukose aus einer Lösung von 0,9 g Fruktose und ebenso aus 1,8 g Fruktose in 10 ccm Wasser ausgeschiedene Öl bald erstarrte, sodaß die Ausscheidung des kristallisierten Osazons schon nach 4 bis 5 Stunden beendet war.

IV. Ebenso zeigte sich die Verzögerung der freiwilligen Osazonabscheidung bei einem Reaktionsgemisch von 1,3 g Glukose und 0,5 g Fruktose. Doch ließ sich in diesem Falle, sowie in dem Versuche III, aus einem Teile der Probe das Osazon durch Impfen und Reiben schon nach 5 Stunden isolieren.

#### Normaler Harn mit Zucker versetzt.

I. 200 ccm normalen Harns wurden in frischem Zustande mit etwas Essigsäure angesäuert, hierauf mit 4 g Glukose versetzt und bei niedriger Temperatur im Vacuum zu einem dünnen Sirup eingedampft. Dieser wurde mit Alkohol aufgeköcht, filtriert, mit Tierkohle behandelt und auf ein Volumen von 30 ccm eingeeengt. Nach Zusatz von 8,5 g Methylphenylhydrazin wurde die Lösung durch 5 Stunden bei gewöhnlicher Temperatur stehen gelassen, filtriert, mit 8,5 ccm 50%iger Essigsäure und 20 ccm Alkohol versetzt und in den Thermostaten bei einer Temperatur von 30° gestellt. Nach 24 Stunden wurde die infolge der etwas größeren Alkoholmenge klar ge-

bliebene Lösung mit Wasser versetzt und längere Zeit gerieben. Das resultierende Produkt wurde nach 2 Stunden abfiltriert und zweimal mit Äther digeriert. Ausbeute 8%.

II. Ein ganz gleich ausgeführter Versuch mit 4 g Fruktose ergab nach 24 Stunden ein dunkles Öl, aus welchem nur 16% der theoretischen Menge an Osazon isoliert werden konnten.

### Diabetesharn.

I. Dieser Harn ergab bei der Polarisation einen Gehalt von 7,1% Traubenzucker: die Titration nach Fehling zeigte 7,5% an reduzierender Substanz, die Polarisation nach erfolgter Gärung eine ganz schwache Linksdrehung entsprechend 0,1%. Es war daher kein Fruchtzucker vorhanden.

Von diesem Harn, der sofort nach der Ausscheidung angesäuert worden ist, wurden 2 Portionen von je 160 ccm im Vacuum unter 40° eingedampft und der sauer reagierende dünnflüssige Sirup nach Vorschrift weiter behandelt. Die resultierende alkoholische Lösung von 30 ccm Volumen, enthaltend ungefähr 12 g Glukose, wurde mit den molekularen Mengen Methylphenylhydrazon und 50%iger Essigsäure versetzt und durch 24 Stunden auf 30° erwärmt. Hierauf wurde das Öl durch Wasserzusatz ausgefällt, durch längeres Reiben festgemacht und mit Äther behandelt. Aus der einen Portion erhielt ich ungefähr 3 g Osazon, die aus dem Öle gewonnen wurden, und außerdem 0,7 g Osazon, das sich aus der vom Öle abgegossenen Mutterlauge nachträglich ausgeschieden hatte. Im ganzen 14,5% der Theorie.

Die andere Portion zeigte die gleichen Verhältnisse und ergab eine gleiche Ausbeute.

Dagegen erhielt ich aus einer in analoger Weise aus dem Harn desselben Patienten gewonnenen alkoholischen Lösung von 33 ccm, enthaltend 7,6 g Glukose, bei 40° ein dunkles Öl, aus dem nur eine Spur Osazon zu isolieren war. Für die Temperatur von 40° war eben selbst diese Konzentration noch viel zu groß.

II. Ein anderer Harn, der bei der Polarisation 6,1% Glukose zeigte, bei der Titration 6,6% reduzierender Substanz

ergab und nach erfolgter Gärung im Sinne von 0,2% links drehte, wurde der Vorschrift entsprechend behandelt und lieferte schließlich eine ungefähr 4,5 g Glukose enthaltende alkoholische Lösung von 53 ccm, welche nach Zusatz der molekularen Menge Methylphenylhydrazin und Essigsäure auf 40° erwärmt, schon nach 16 Stunden ein Öl ergab, aus dem 0,9 g = 10% der theoretischen Menge an Osazon gewonnen wurden.

III. Eine zweite Probe dieses Harns mit 3 g Glukose in 35 ccm einer wenig alkoholischen Lösung gab nach 24 Stunden bei 37° ungefähr 0,72 g = 10% Osazon. Auch hier schied sich aus der vom Öle abgegossenen Flüssigkeit nach einiger Zeit kristallinisches Osazon aus, ohne daß geimpft worden wäre.

Analoge Versuche mit Ascites- oder Pleuraflüssigkeiten konnten aus Mangel an Material nicht durchgeführt werden, doch reichen bereits die obigen Versuche vollständig hin, um die Unbrauchbarkeit des Neuberg-Straußschen Verfahrens in seiner gegenwärtigen Form zu demonstrieren.

Es muß deshalb dahin gestellt bleiben, ob in den von Neuberg und Strauß untersuchten Körpersäften tatsächlich Fruktose enthalten war. Beweisend für die Gegenwart von Fruchtzucker ist die Abscheidung des Osazons nur dann, wenn sie bei Zimmertemperatur in höchstens 5 Stunden erfolgt, doch ist die freiwillige Abscheidung in dieser Zeit, wie schon oben erwähnt wurde, nur unter besonders günstigen Verhältnissen zu erzielen. Jedenfalls muß, sobald Fruktose vorhanden ist, die Osazonbildung innerhalb dieser Zeit vor sich gegangen sein, wenn auch infolge ungünstiger Umstände die freiwillige Abscheidung nicht erfolgt ist. In diesen Fällen ist es daher notwendig, das Osazon durch Impfen und Reiben eventuell nach vorhergegangenem Wasserzusatz zu isolieren. Weit ungünstigere Fälle als Gemische reiner Fruktose und Glukose sind die menschlichen Körpersäfte. Wird die diesbezügliche Untersuchung ergeben, daß in diesen Produkten, sobald sie mit Fruktose versetzt sind, das Osazon nach 5stündiger Reaktionsdauer bei Zimmertemperatur sich in verhältnismäßig einfacher Weise stets isolieren läßt, so wird die Bildung des von Neuberg

zuerst dargestellten Methylphenylfruktosazons tatsächlich zum Nachweise der Fruktose dienen können. Es bleibt daher vorläufig die Seliwanoffsche Reaktion noch die beste Methode zum Nachweise des Fruchtzuckers, doch ist dieselbe genau unter den von mir angegebenen Bedingungen<sup>1)</sup> (Zusatz von etwas Resorcin und soviel konzentrierter Salzsäure, daß die Lösung 12% HCl enthält, und höchstens 20 Sekunden langes Erhitzen) auszuführen, wobei es sich empfehlen dürfte, den erhaltenen Farbstoff nach Rosin<sup>2)</sup> spektralanalytisch zu untersuchen.

---

<sup>1)</sup> Monatshefte für Chem., Bd. XXV, S. 611.

<sup>2)</sup> Rosin, H., Bd. XXXVIII, S. 555.