

Über eine quantitative Zuckerbestimmungsmethode im Blute.

Von

E. Herzfeld.

(Aus dem chem. Laboratorium der mediz. Universitätsklinik Zürich)

Direktor: Prof. Dr. H. Eichhorst.

(Der Redaktion zugegangen am 16. März 1912.)

Unter den Kohlenhydraten hat man im Blute zuerst den Traubenzucker identifiziert. Später wurden Fruktose, Isomaltose und Pentose nachgewiesen. Bei der Reduktionsfähigkeit des Blutes spielen also neben Traubenzucker auch diese Faktoren mit, welche bei einer Hyperglykämie sogar stark vermehrt sein sollen. Auch wird von Verbindungen des Traubenzuckers mit anderen Komplexen gesprochen: z. B. Jecorin, eine Lecithinglukose. Diese Frage, wie auch eine neuere, daß ein Teil des Zuckers mit Eiweiß verbunden vorkommt, ist bisher noch nicht entschieden worden. Es ist nun verständlich, daß man durch Titration einen höheren Zuckergehalt findet als polarimetrisch, so daß man eigentlich zur Bestimmung von Dextrose nur die polarimetrische Methode anwenden sollte. Da man aber nicht immer über solche Blutmengen verfügt, die eine polarimetrische Bestimmung ermöglichen, muß man sich oft mit den Reduktionsmethoden begnügen.

Für den quantitativen Nachweis des Zuckers im Serum und Vollblut ist es durchaus notwendig, nur frisches Blut zu benützen, da der Zuckergehalt nach Cl. Bernard infolge der Einwirkung eines glykolytischen Fermentes mehr oder weniger abnimmt, ja sogar oft verschwindet. Cl. Bernard gibt für die Zuckerbestimmung folgende Methode an: 30—50 ccm Blut werden in einer Porzellanschale über gleichen Gewichtsteil Natriumsulfat aufgefangen. Die Masse wird filtriert und im Filtrat titrimetrisch oder polarimetrisch der Zuckergehalt bestimmt.

Michaelis und Róna beschreiben folgende Methode: 30—40 g Blut werden mit Wasser zu 1 l aufgefüllt und hierzu etwa 3 ccm Eisenlösung gegeben. Nach etwa 10 Minuten setzt man 1—1,5 g MgSO_4 in Substanz hinzu, schüttelt 1—2 Minuten und filtriert; das Filtrat wird bei schwach saurer Reaktion konzentriert. Der Zucker wird polarimetrisch oder titrimetrisch bestimmt.

Nach Schenk versetzt man 50 ccm Blut + 50 ccm H_2O mit 100 ccm 2%iger HCl und 100 ccm 5%igem Sublimat. Am nächsten Tage wird filtriert, das Filtrat mit H_2S vom Quecksilber befreit und der H_2S durch einen Luftstrom entfernt. Nach Abstumpfen der sauren Reaktion engt man im Vakuum ein und füllt mit H_2O zu 50 ccm auf.

Nach Bang extrahiert man den Zucker durch Alkohol unter Verwendung der Zentrifuge: der Alkohol wird verjagt, der Rückstand in Wasser gelöst und die Verunreinigungen durch Kaolin, oder noch besser durch Eisen entfernt. Im Filtrate wird der Zucker am besten titrimetrisch bestimmt.

Für geringere Zuckermengen in wenig Blut ist das Verfahren von K. Reicher und H. Stein angegeben. Auf 10 ccm $\text{cc-H}_2\text{SO}$ wirft man eine α -Naphtholtablette von 0,05 g, worauf man 2 ccm mit Eisen enteiweißtes Blutserum zufließen läßt. Dann soll vorsichtig umgeschwenkt werden und nach dem Abkühlen das Volumen mit $\text{cc-H}_2\text{SO}_4$ auf 20 ccm ergänzt werden. Der Vergleich mit einer Testlösung 0,02% Traubenzucker soll mit dem Chronophotometer von J. Plesch ausgeführt werden. Zu bemerken ist, daß verschiedene Kohlenhydrate ungleiche Nuancen geben, daß Temperatur und Tropfengröße bei der Mischung mit $\text{cc-H}_2\text{SO}$ einen Einfluß haben.

Verfasser möchte ebenfalls für geringe Zuckermengen eine einfache Methode beschreiben, die eine rasche und ziemlich exakte Bestimmung ermöglicht.

Prinzip: Blut oder Blutserum kann mit einer Metaphosphorsäurelösung quantitativ vom Eiweiß befreit werden und im Filtrat können die Kohlenhydrate auf Zusatz von Alkali, beim Erhitzen mit einer eingestellten Methylenblaulösung titriert werden.

Nach den Angaben von A. Ihl und A. Herzfeld wird nämlich eine wässrige Methylenblaulösung (1 : 1000) in ätz- oder sodaalkalischer Lösung durch Aldosen, Ketosen und Dextrine beim Erhitzen entfärbt (Leukomethylenblau). Bei einem blinden Versuch trat keine Entfärbung ein, auch auf Zusatz von Harnstoff nicht, wohl aber wirken auf die Methylenblaulösung Eiweiß, Cholesterin und Bilirubin ein.

Bei der Prüfung einer Lösung, welche 1% Traubenzucker und 1% Eiweiß enthielt, konnte mit einer 10%igen Metaphosphorsäurelösung das Eiweiß gefällt werden und das Filtrat, wo keine Spur von Eiweiß zu finden war, enthielt 0,98% Traubenzucker (polarimetrisch).

Erforderliche Lösungen :

1. Wässrige Methylenblaulösung 1 : 100000,
2. 20%ige Kalilauge,
3. 10%ige Metaphosphorsäure,
4. 0,1%ige Traubenzuckerlösung.

Man stellt sich eine genaue 0,1%ige Methylenblaulösung her, entnimmt davon 1 ccm und ergänzt mit H_2O auf 100 ccm, so hat man Lösung 1.

Ausführung. Zu einer genau gemessenen Menge der 0,1%igen Traubenzuckerlösung setzt man 0,5 ccm 20%ige KOH, erwärmt vorsichtig auf einem weißen Asbestpapier über einer sehr kleinen Flamme fast bis zum Sieden. Sobald die heiße Flüssigkeit beginnt sich gelblich zu färben, läßt man aus einer Bürette obige Methylenblaulösung tropfenweise an der Wand des Kölbchens vorsichtig zulaufen, wobei das Erhitzen fortgesetzt und ein Schütteln vermieden werden soll. Wenn sich der letzte blaue Tropfen auch beim vorsichtigen Vermengen mit einem Glasstab nicht entfärbt, ist die Reaktion beendet. Mit einem weißen Hintergrund kann man den Farbumschlag scharf beobachten.

Aus den folgenden Zahlen ist ersichtlich, daß die Reaktion ziemlich quantitativ verläuft. 0,001 g Traubenzucker kann im Mittel 1,6 ccm Methylenblaulösung entfärben; folglich würde 1 ccm Methylenblaulösung = 0,000625 g Traubenzucker sein.

und so könnte man mit 0,1 ccm schon 0,0000625 g Traubenzucker nachweisen.

Traubenzucker g	Verbraucht ccm Methylenblau			
	1.	2.	3.	4.
0,001	1,5	1,6	1,7	1,6
0,002	3,0	3,1	3,4	3,3
0,003	4,9	5,0	4,8	4,9
0,004	6,6	6,5	6,6	6,5
0,005	8,2	8,3	8,1	8,3
0,006	9,8	9,6	9,8	9,7
0,007	11,1	11,3	11,5	11,3
0,008	13,0	13,1	12,9	13,2
0,009	14,4	14,6	14,5	14,5
0,010	16,9	17,0	17,1	16,9

Bestimmung im Blute. 3—5 ccm frisches Blutserum oder Vollblut werden mit der etwa 3fachen Menge 10%iger Metaphosphorsäure versetzt, nach etwa 10 Minuten filtriert und der Niederschlag mit etwas Metaphosphorsäure nachgewaschen. Das wasserklare Filtrat (frei von Eiweiß, Cholesterin und Bilirubin) wird mit KOH neutralisiert, und noch 0,5 ccm 20%ige KOH hinzugefügt, vorsichtig erhitzt und beim Eintreten einer gelblichen Farbe, wie oben angegeben, bis zur schwachen Blaufärbung titriert. Es mögen folgende Beispiele angeführt werden.

			Traubenzucker
Blut K	2,8 ccm verbraucht	2,9 ccm Methylenblau	= 0,065%
» 2		2,1	= 0,066%
» W	2,4	3,7	= 0,096%
» 5		7,9	= 0,099%

Vom Blut W wurden noch 10 ccm mit Metaphosphorsäure vom Eiweiß befreit, filtriert, das Filtrat neutralisiert und mit Essigsäure und Phenylhydrazin (5 Tropfen Phenylhydrazin, 10 Tropfen Eisessig) auf dem Wasserbade $\frac{1}{2}$ Stunde erhitzt. Nach dem Abkühlen wurden die schönen gelben Krystallbüschel von Glukosazon durch ein gewogenes Filter filtriert, gewaschen, getrocknet und gewogen.

$$a = 0,0151 \text{ g in } 10 \text{ ccm Blut}$$

Gluko- Glu-
sazon kose

$$358 : 198 = a : x$$

$$x = a \cdot \frac{198}{358} = 0,0151 \cdot 0,553$$

$x = 0,00835 \text{ g Traubenzucker in } 10 \text{ ccm Blut,}$
folglich $0,084\%$ Traubenzucker.

Die Bestimmung wurde einen Tag später vorgenommen, so daß man nach Cl. Bernard den Verlust an Traubenzucker zum Teil erklären könnte (Wirkung des glykolytischen Fermentes). Ob aber die fehlenden $0,015\%$ auf Rechnung der übrigen reduzierenden Substanzen geschrieben werden sollen, ist noch nicht erwiesen.

Jedenfalls kann man mit Hilfe dieser Methode die Menge der reduzierenden Körper im Blut einfach und ziemlich genau feststellen.

Literatur.

C. Bernard, Mem. de la Soc. Biol., Bd. 1, S. 121 (1849).

Michaelis u. Rona, Biochem. Zeitschr., Bd. 7, S. 332 (1908); Bd. 14, S. 479 (1908).

Schenk, Arch. f. d. ges. Physiol., Bd. 55, S. 203 (1894).

Bang, Biochem. Zeitschr., Bd. 7, S. 327 (1908).

K. Reicher u. H. Stein, Verhandl. d. deutsch. Congr. f. inn. Medizin, Bd. 27, S. 401 (1910).

J. Plesch, Zeitschr. f. klin. Medizin, Bd. 63, S. 472 (1907).

A. Ihl, Zeitschr. f. analyt. Chemie, Bd. 29, S. 368 (1890).

A. Herzfeld, Chem. Ztg., Bd. 12, S. 25 (1888).