

Die Mikrobestimmung des Traubenzuckers nach dem Verfahren von J. Bang.

Von

Berthold Oppler.

(Mit 1 Kurvenzeichnung.)

(Aus der medizinischen Poliklinik der Universität München.
(Der Redaktion zugegangen am 12. Januar 1920.)

Trotz der auch von Bang eingeräumten Tatsache, daß seine Mikromethode der quantitativen Blutzuckerbestimmung wie alle Reduktionsmethoden nur annähernd richtige Werte ergibt, muß das Verfahren, wenn es sich in der Tat als zuverlässig erweist, wegen der nunmehr erreichten Einfachheit seiner Ausführung¹⁾ und wegen der geringen Blutmengen, die es erfordert, als ein wirklicher Fortschritt anerkannt werden. Eine Nachprüfung des Verfahrens an reinen Glukoselösungen ergab folgende, aus der Tabelle ersichtliche Tatsachen.

I. Tabelle.

Glukose mg berechnet	ccm Thiosulfat titer num. log. 75 696	ccm = $\frac{1}{100}$ n. Jodat	f = 1:
0,545	0,92 } 0,92 } 0,920	1,517	278
0,491	1,26 } 1,25 } 1,255	1,326	271
0,436	1,56 } 1,57 } 1,565	1,149	264
0,382	1,82 } 1,82 } 1,820	1,003	263
0,327	2,14 } 2,13 } 2,135	0,823	252

¹⁾ Biochem. Zeitschr. 92, 5, 6, S. 344.

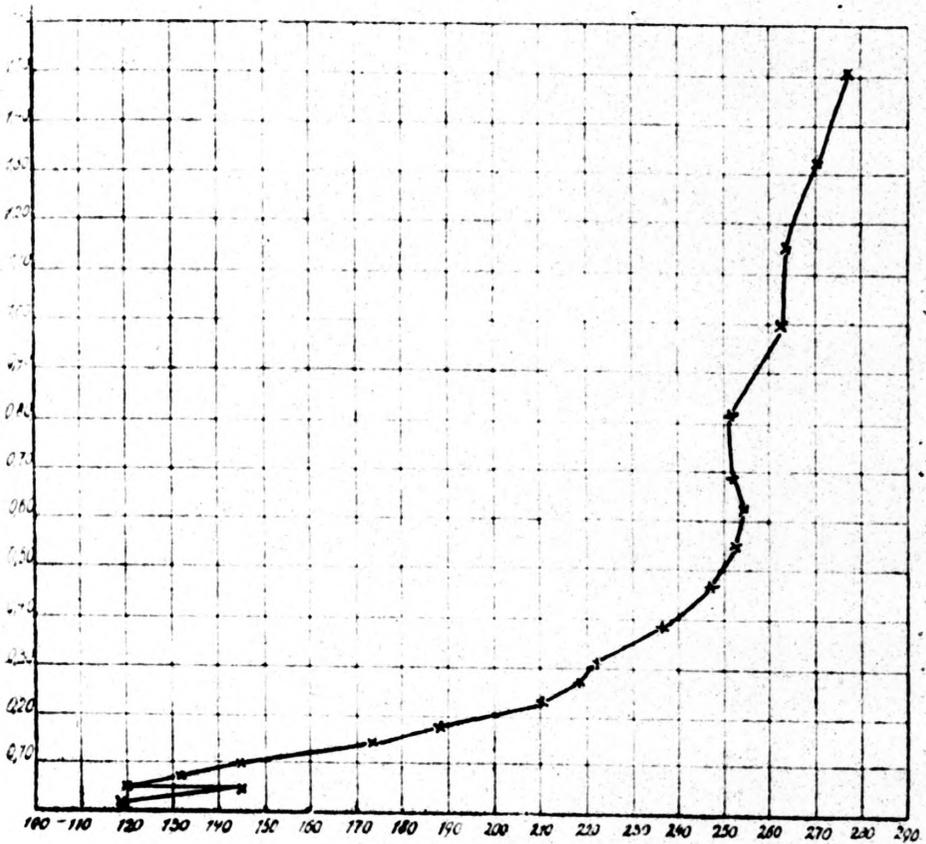
Glukose mg berechnet	cem Thiosulfat titer num. log. 75696	cem = $\frac{1}{100}$ n. Jodat	f = 1
0,273	2,37 } 2,370	0,689	252
0,246	2,47 } 2,480	0,626	255
0,218	2,61 } 2,610	0,552	253
0,191	2,71 } 2,745	0,474	248
0,164	2,90 } 2,910	0,380	232
0,137	3,03 } 3,040	0,306	223
0,123	3,10 } 3,105	0,269	219
0,110	3,18 } 3,180	0,226	211
0,096	3,23 } 3,260	0,180	188
0,082	3,32 } 3,325	0,143	174
0,068	3,32 } 3,340	0,099	145
0,055	3,44 } 3,450	0,072	132
0,041	3,48 } 3,490	0,049	120
0,034	3,49 } 3,490	0,049	145
0,027	3,52 } 3,535	0,023	119

Nach Bang und Hatlehoel¹⁾ ist zur Berechnung des Glukosewertes die verbrauchte $\frac{1}{100}$ n. Jodsäure mit dem Faktor

$f = \frac{1}{2,8}$ zu multiplizieren, da bei richtiger Alkaleszenz eine

¹⁾ Biochem. Zeitschr. 87. 3, 4. S. 267.

„ganz regelmäßige Reduktion“ eintritt. Eine empirische Tabelle halten die Autoren daher für überflüssig. Da über den Reduktionsverlauf und die Berechnung der Analysenwerte bei Verwendung einer sauren Jodatlösung Angaben fehlen, so muß geschlossen werden, daß die früheren Angaben auch für diesen Fall ihre Geltung behalten.



Berechnet man bei Bestimmung wechselnder Glukosemengen die für die Gewichtseinheit Glukose erforderliche Jodatmenge in ccm, so erhält man — Spalte 4 — den Faktor f und erkennt, daß dieser nur bei Verwendung von ca. 0,5 mg Glukose mit dem von Bang gefundenen Werte genügend übereinstimmt. Die graphische Darstellung von Tabellenspalte 3 als Ordinate und 4 als Abszisse in Form einer Kurve läßt noch deutlicher als die Tabelle selbst erkennen, daß der Jodverbrauch der angewandten Zuckermenge nicht streng proportional ist. Der Reduktionsverlauf weist zahlreiche Unregelmäßigkeiten auf. In einer weiteren Versuchsserie, bei der

ebensowenig wie vorher Störungen des Reduktionsverlaufs beobachtet werden konnten, fand sich bei 0,515 mg berechneten Glukosegehalts als Wert für $f = \frac{1}{120}$. In wiederum anderen Versuchen bewegten sich die Werte für f zwischen den angeführten Extremen. In der erwähnten Serie mit $f = \frac{1}{120}$ zeigte sich ferner, daß mit sinkender Glukosemenge der Jodatverbrauch sich so schnell verminderte, daß nunmehr für 0,103 und 0,052 mg Glukose die Differenz nur noch 2 Tropfen der Thiosulfatlösung entsprach. Das ist ein Wert, welcher bereits die Grenze des Titrationsfehlers erreicht. Es erinnert das an eine von Bang bei Verwendung einer alkalischen Jodatlösung gemachte Beobachtung¹⁾, die ihn bestimmte, diese Modifikation seiner Methode zu verlassen. Eine sichere Erklärung der Erscheinung vermochte Bang nicht zu geben. Es liegt daher die Vermutung nahe, daß in diesen Versuchen Bangs das gleiche störende Moment wie in meinen Versuchen sich geltend macht.

Die befriedigende Übereinstimmung in der Mehrzahl meiner Analysenpaare läßt Meßfehler mit ziemlicher Sicherheit ausschließen. Dagegen konnte in zahlreichen Versuchen festgestellt werden, daß die von Bang festgesetzte Reduktionsdauer von 4 Minuten zur Erzielung gleichmäßiger Ergebnisse unter den von mir gewählten Versuchsbedingungen noch nicht genügte, sondern auf $4\frac{1}{2}$ Minuten verlängert werden mußte. Daraus ergab sich ein Hinweis auf die Richtung, in welcher der Fehler zu suchen war. Für die beobachteten Störungen sind bei unveränderter Alkaleszenz Schwankungen der Reduktionstemperatur in der Hauptsache verantwortlich zu machen. Diese können auf verschiedene Weise zustande kommen. Differenzen in der Temperatur des Arbeitsraumes an verschiedenen Tagen, Schwankungen der Intensität des zugeführten Dampfstromes als Folge wechselnden Gasdrucks genügen bereits, um den Faktor f erheblich zu verändern. Man könnte auf Grund der gegenteiligen Angaben von Bang gegen meine Versuche einwenden, daß bei einer konstanten Reduktions-

¹⁾ Biochem. Zeitschr. 92, 5, 6, S. 344.

temperatur der Faktor f eine konstante Größe, seine Änderung demnach nur eine scheinbare und in Wahrheit der Ausdruck eines nahezu konstant sinkenden Gasdrucks sei. Das ist aber unrichtig. Denn, wenn man von sämtlichen Analysenpaaren zuerst die eine Hälfte verarbeitet und dann, wiederum mit dem höchsten Werte beginnend, die Kontrollbestimmungen folgen läßt, so erhält man das gleiche Ergebnis. Bang und Hatlehoel¹⁾ haben selbst ja auch schon bemerkt, daß sich bei starken Schwankungen der Dampfzufuhr geringe Differenzen zwischen berechneten und gefundenen Zuckerwerten ergeben.

Trotz Einführung des indirekten Kochens mit Wasserdampf ist es demnach bisher nicht völlig gelungen, eine gleichmäßige Reduktion zu erzielen.

Welchen Wert man für f und damit für Glukose findet, bleibt unter diesen Umständen mehr oder weniger Sache des Zufalls. Als praktische Schlußfolgerung ergibt sich aus den mitgeteilten Versuchen:

Für die Bestimmung des Glukose- (= Blutzucker-) Wertes ist eine empirische Tabelle erforderlich. Die Aufstellung einer allgemein gültigen Reduktionstabelle ist an eine feste Reduktionstemperatur und Einwirkungsdauer derselben gebunden. Diesen Bedingungen wird die indirekte Kochmethode mit Wasserdampf bisher in befriedigender Weise nicht völlig gerecht. Die Methode verlangt, wenn sie zu brauchbaren Ergebnissen führen soll, auf jeden Fall Übung und Erfahrung. Die mitgeteilten Versuche zeigen aufs neue, wie schwierig es ist, Glukosemengen von weniger als 1 mg quantitativ zu bestimmen. Wo man die untere Grenze ziehen soll, muß von Fall zu Fall entschieden werden. Für Werte bis zu 1 mg abwärts ist in der Methode von Bertrand ein gut ausgearbeitetes Verfahren gegeben, welches als zuverlässig nun wohl allgemein anerkannt wird und vor der jodometrischen Bestimmung jedenfalls den Vorteil eines scharfen, auch bei künstlicher Beleuchtung noch deutlich erkennbaren Farbenschlags voraus hat. In

¹⁾ l. c.

Verbindung mit der früher von mir beschriebenen „fraktionierten Reduktion“¹⁾ gelingt es, was auch von anderer Seite bestätigt wird²⁾, vermittels der Bertrandschen Methode die verschiedenen, reduzierenden Substanzen innerhalb gewisser Grenzen noch weiter zu differenzieren.

So wünschenswert es auch wäre, ein Verfahren zu besitzen, welches die quantitative Bestimmung kleinster Werte in zuverlässiger Weise ermöglicht, so ist doch wohl auf Grund obiger Versuche die zweifelnde Frage berechtigt, ob das von Bang erstrebte Ziel, die Bestimmung in wenigen Blutstropfen auszuführen, wirklich erreichbar ist. Richter-Quittner³⁾ gelangt zu dem gleichen Ergebnis und führt die Bestimmung daher in 3 ccm Plasma (Blut) aus. Seiner Empfehlung des Ferrum oxydat. dialysat. als Enteiweißungsmittel kann ich mich jedoch auf Grund früher⁴⁾ mitgeteilter Versuche nicht unbedingt anschließen. Aus alledem ergibt sich, daß die Bangsche Methode unter Berücksichtigung der mitgeteilten Erfahrungen jedenfalls einer Umarbeitung bedarf. Da bei der gegenwärtig in Deutschland herrschenden Kohlennot mit einer Besserung der Gas- und Elektrizitätsversorgung in absehbarer Zeit nicht zu rechnen ist, so bin ich nicht in der Lage, diese Versuche mit Aussicht auf Erfolg weiter zu führen.

II. Experimentelles.

Zur Vermeidung von Meßfehlern wurde für je eine Lösung stets dasselbe, sorgfältig entfettete Meßgerät benützt. Die Abmessung der verschiedenen Glukosetestlösungen jedoch wurde stets mit ein und derselben Pipette vorgenommen. Die $\frac{1}{20}$ -normal Thiosulfatlösung wurde aus einer Mikrobürette⁵⁾ von 4 ccm Inhalt mit Schellbachstreifen abgemessen, welche aus einem seitlich angebrachten Behälter und beiderseits ange-

¹⁾ Diese Zeitschr. Bd. 75, S. 80.

²⁾ Diese Zeitschr. Bd. 86, S. 484. Hirschberg — 100, S. 215. Schumm.

³⁾ Biochem. Zeitschr. Bd. 96, S. 92.

⁴⁾ Diese Zeitschr. Bd. 64, S. 399.

⁵⁾ Lautenschläger-München.

schmolzenem, mit Glashahn versehenen Zuflußrohr gespeist wird. Natronkalkrohre und Bekleben mit schwarzem Papier schützen die Lösung gegen die Einwirkung von CO_2 und Licht. Die Entnahme kleinster Tropfen, entsprechend 0,01—0,02 ccm, aus der Mikroburette unter Wahrung der Möglichkeit, sie ordnungsgemäß zu reinigen, gelingt am leichtesten, wenn man an das etwas verjüngte, mit Glashahn versehene Burettenende eine lange Capillare Glas auf Glas mit Schlauchstück anschließt.

Verwandte Lösungen.

1. Die Salzlösung: 400 g KCl in ca. 1600 ccm H_2O + 1,5 ccm 25%ige HCl (Acid. hydrochl. dil. Ph. G.) und 3,0 g Uranylacetat in 200 ccm H_2O wurden getrennt gelöst und nach erfolgter Lösung gemischt. Es wurden 800 mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ hinzugefügt und auf 2000 ccm mit H_2O ergänzt.
2. Die Alkalilösung enthält 75 g K_2CO_3 und 20 g Seignettesalz im Liter. Beide Lösungen wurden filtriert.
3. Die Jodatlösung: An Stelle des analysenrein nicht käuflichen KIO_3 wurden 3,2496 g Kal. bijodicum puriss. pro analysi (Kaliumbijodat Merck) mit $\frac{1}{10}$ normal H_2SO_4 auf 1 l gebracht. 100 ccm dieser Lösung wurden mit Acid. sulfuric. dil. (Ph. G.) zu 1 l $\frac{1}{100}$ normal Jodatlösung verdünnt. Aufbewahrung in brauner Flasche.
4. Die $\frac{1}{200}$ normal Natriosulfatlösung wurde in brauner Flasche mit Natronkalkrohr aufbewahrt.
5. 10%ige JK-Lösung.
6. 1 g lösliche Stärke in 100 ccm 1%iger KCl-Lösung. Vom Niederschlag wurde nach einigen Tagen abfiltriert.
7. Die Zuckertestlösungen wurde aus einer genau gewogenen ca. 2%igen, auf ihren Gehalt polarimetrisch kontrollierten Stammlösung bereitet. Die Verdünnungen wurden mit an Toluol gesättigtem, dann filtrierten H_2O , später mit Borwasser hergestellt. Die Änderung der Alkaleszenz durch den Gehalt an Borsäure spielt praktisch keine Rolle.

Zur Titerstellung wurden 1 ccm Toluol- bzw. Borwasser, 13 ccm Salzlösung, 2 ccm Alkalilösung und 2 ccm Jodatlösung in einem 100 ccm fassenden Erlenmeyerkolben aus Jenenser Glas gemischt, mit H_2O auf ca. 45 ccm verdünnt. Dann wurden zwei Tropfen JK-Lösung und zwei Tropfen Stärkelösung hinzugefügt und mit Thiosulfatlösung bis zur Entfärbung titriert. Der Farbumschlag erfolgt ganz allmählich. Es bedarf einiger Übung, um unter Benützung einer Vergleichsprobe das Ende der Titration zu erkennen. Tageslicht ist erforderlich.

Der Blindversuch wurde in entsprechender Weise bei $4\frac{1}{2}$ Minuten Kochdauer mit Wasserdampf angestellt. Um gleichmäßiges Sieden zu erzielen, wurde das Wasser im Dampfenwickler mit ausgeglühtem Talkum versetzt. Nach Verlauf der $4\frac{1}{2}$ Minuten erfolgte Zusatz von 2 ccm Jodatlösung. Nach weiteren 30 Sekunden wurde die Dampfeinleitung unterbrochen und das Einleitungsrohr abgespritzt, schließlich der Kolben ohne Umschütteln zur Seite gestellt und der Inhalt vor dem Titrieren mit ca. 25 ccm H_2O verdünnt. Bei den Versuchen mit Glukose wurde 1 ccm der betreffenden Lösung benützt bzw. ein Bruchteil, der dann auf 1 ccm ergänzt wurde.

Titerstellungen und Blindversuche wurden den eigentlichen Versuchen vor- und nachgeschaltet. Der Titer hat sich in $2\frac{1}{2}$ Monaten fast nicht verändert. Bei den Blindversuchen ergab sich dauernd ein Verbrauch von durchschnittlich 0,043 ccm $\frac{1}{100}$ normal Jodatlösung

Da M. Richter-Quittner¹⁾ angibt, mit der von Bang angegebenen, sauren Cu-Jodatlösung gute Resultate erhalten zu haben, wurden auch Versuche mit dieser Lösung angestellt. Das Ergebnis blieb das gleiche.

Die Berechnung der Glukose = x erfolgt nach der Formel $x = \frac{1}{2}(2,00 + n) - a \cdot f$, worin n den ca. $\frac{1}{200}$ normal Thiosulfatverbrauch in Kubikzentimetern im Blindversuch, a bei Gegenwart von Glukose, umgerechnet in $\frac{1}{100}$ normal Jodsäure bedeutet.

¹⁾ Biochem. Zeitschr. 96, 1—3, S. 92.