

Über den Befund von Ameisensäure im menschlichen Blute.

Von

Wilhelm Stepp.

(Aus der Medizinischen Klinik zu Gießen [Prof. Voit].)
(Der Redaktion zugegangen am 21. Januar 1920.)

Vor kurzem habe ich in dieser Zeitschrift über Untersuchungen berichtet, die sich mit den reduzierenden Substanzen des menschlichen Blutes beschäftigten¹⁾. Es galt festzustellen, ob die durch Reduktionsmethoden (Bertrand und Lehmann-Maquenne) ermittelten „Blutzuckerwerte“ auch wirklich nur Glukose anzeigten oder ob neben Traubenzucker noch andere reduzierende Substanzen in größerer Menge im Blute sich fänden. Zu diesem Zwecke wurden neben der Reduktion auch die Polarisation und die Gärung²⁾ geprüft. Für die beiden letzteren Methoden waren die mit Phosphorwolframsäure enteweißten Blutproben vorher noch von der Phosphorwolframsäure zu befreien (was durch neutrales Bleiacetat leicht zu bewerkstelligen war); nach Entfernung des Bleis mit Schwefelwasserstoff konnten sie dann leicht im Vakuum bei 38° C. auf ein kleines Volumen eingeengt werden.

Die bei diesen Untersuchungen gewissermaßen als Nebenprodukt gewonnenen Destillate enthielten nun neben der dem Bleiacetat entstammenden Essigsäure noch eine andere saure Substanz. Davon konnte man sich sehr leicht überzeugen durch einfache Destillation der bei der Phosphorwolframsäurefällung³⁾ erhaltenen Blutfiltrate. Und das gleiche Ergebnis hatten Versuche, in denen Serum mit kolloidalem Eisen-

¹⁾ Diese Zeitschr. Bd. 107, S 29 (1919).

²⁾ Mittels des Lohnsteinschen Präzisionsgärungssaccharimeters.

³⁾ Ohne Zusatz von Schwefelsäure.

hydroxyd (unter alleinigem Zusatz von primärem Kaliumphosphat als Elektrolyt) enteiweißt und dann der Destillation unterworfen war. Bei diesen letzteren Versuchen war die saure Reaktion bei der Destillation nur durch das saure Phosphat hergestellt und jeder Zusatz anderer Substanzen vermieden worden; daher waren die dabei erhaltenen Befunde von besonderer Bedeutung.

Daß die saure Reaktion der Destillate nicht etwa in der Anwesenheit kleiner Mengen von Salzsäure ihre Ursache hatte, ließ sich leicht zeigen durch Prüfung mit Silbernitrat, deren Ergebnis stets negativ war.

In erster Linie mußte an eine flüchtige niedere Fettsäure gedacht werden. Um die fragliche Säure in stärkerer Konzentration zu erhalten, wurden die gesammelten Destillate mit Soda bis zur neutralen bzw. schwach alkalischen Reaktion versetzt und auf dem Wasserbad bis zur Trockne eingedampft. Der Rückstand, der bei den mit Phosphorwolframsäure verarbeiteten Blutproben (infolge der reichlichen aus dem Bleiacetat stammenden Essigsäuremengen) vorwiegend aus Natriumacetat bestand, wurde alsdann nach den bekannten Vorschriften mit Quecksilberchlorid auf Ameisensäure geprüft¹⁾. Ich ging dabei in der Regel folgendermaßen vor: 0,2 g des Trockenrückstands wurden in 3 ccm destillierten Wassers gelöst, dann eine kleine Messerspitze reinsten Natriumacetats, das als frei von Formiat befunden war, zugegeben und nun vorsichtig tropfenweise mit 25%iger Salzsäure angesäuert, bis blaues Lackmuspapier schwache Rotfärbung zeigte. Da die Reaktion nur dann vollständig verläuft, wenn die Lösung nur wenig Wasserstoffionen enthält, wurde das Auftreten freier Mineralsäure peinlich vermieden, was sich durch die dauernd negative Kongoreaktion kontrollieren ließ. In unseren Fällen machte dieser Punkt nie Schwierigkeiten, da durch die Anwesenheit reichlicher Mengen von Natriumacetat (aus der Umsetzung des Bleiacetats) die Dissoziation der durch die Salzsäure frei

¹⁾ Fincke, Nachweis und Bestimmung der Ameisensäure. Biochem. Zeitschr. Bd. 51, S. 253 (1913). Hier finden sich zahlreiche Literaturhinweise.

gemachten Essigsäure zurückgedrängt wurde. Zu der Lösung wurde dann schließlich 1 Tropfen einer natriumacetathaltigen Quecksilberchloridlösung (50 g HgCl_2 , 27,5 g Natriumacetat im Liter)¹⁾ gegeben und das Reagenzrohr für mehrere Stunden in ein heißes Wasserbad von ca. 70° C. Temperatur gebracht. Späterhin wurde nach dem Vorschlage von Fincke²⁾ die Natriumacetat enthaltende Quecksilberchloridlösung auch noch mit einem Zusatze von Kochsalz versehen. Die Lösung hatte dann die folgende Zusammensetzung: 200 g Sublimat, 300 g Natriumacetat, 80 g Kochsalz, Wasser ad 1000 ccm. Der Zusatz von Natriumchlorid hat die Aufgabe, gewisse Verunreinigungen des Quecksilberchlorürniederschlags zu vermeiden.

Fast in allen in dieser Weise untersuchten Fällen trat schon kurz nach dem Einsetzen ins Wasserbad eine weißliche Trübung des Reaktionsgemisches ein. Die Trübung nahm dann je nach den Fällen in mehr oder minder starkem Maße zu und häufig setzte sich ein deutlicher Niederschlag zu Boden. Es war kein Zweifel, es hatte eine beträchtliche Kalomelbildung stattgefunden.

Die Frage war nun die, ob es erlaubt wäre, diese Reduktionswirkung auf Ameisensäure zu beziehen, oder ob vielleicht andere reduzierende Stoffe zu berücksichtigen wären. Seitdem man die Reduktion von Quecksilberchlorid zu Quecksilberchlorür zur Erkennung der Ameisensäure benützt, hat man stets auch an die Möglichkeit von Täuschungen durch die Anwesenheit anderer reduzierender Substanzen gedacht. Sehr eingehend beschäftigt sich Fincke mit dieser Fehlerquelle in seiner eingehenden Arbeit³⁾. Von anorganischen Säuren sind nach ihm die schweflige Säure zu berücksichtigen, von organischen die Sorbinsäure, die Glyoxylsäure, die Lävulinsäure, die Zimtsäure, die Salicylsäure und die Fumarsäure. Mit der Mehrzahl dieser Säuren braucht man bei der Verarbeitung menschlichen Blutes wohl nicht zu rechnen, überdies erkennt man solche Säuren, wie Fincke

¹⁾ Pringsheim in Abderhaldens Handbuch der biochem. Arbeitsmethoden Bd. II, S. 22 (1910).

²⁾ l. c.

³⁾ l. c.

bemerkt, „an dem abweichenden Aussehen des Niederschlags, der nicht kristallinisch und nicht weiß oder gelblich ist wie Quecksilberchlorür“. Trotzdem schien es mir unbedingt wünschenswert, den Nachweis der Ameisensäure noch schärfer zu führen. Die Identifizierung durch Darstellung eines geeigneten Salzes (am besten des Bleisalzes) war angesichts der geringen, höchstens Milligramme betragenden Mengen von vornherein aussichtslos. Als beste und unbedingt zuverlässige Reaktion auf Ameisensäure gilt die von Fenton und Sisson¹⁾ angegebene. Hierbei wird die Ameisensäure in saurer Lösung durch Magnesium zu Formaldehyd reduziert. Wegen seiner Zuverlässigkeit wurde das Formaldehydverfahren vom Kaiserlichen Gesundheitsamte als amtliches Verfahren vorgeschlagen.

Ich habe die Prüfung der nach Neutralisation mit Soda zur Trockne gebrachten Destillate mit Hilfe dieser Reaktion in der folgenden Weise durchgeführt: 1–2 g des Pulvers wurden in einem kleinen Erlenmeyerkölbchen in 10 ccm Wasser gelöst und mit 5 ccm 25%iger Salzsäure versetzt. In diese Lösung wurden 0,5 g metallischen Magnesiums (in Pulverform) in ganz kleinen Mengen allmählich im Verlaufe von etwa 2 Stunden eingetragen. Wenn man dabei ganz langsam vorgeht, indem man mit einem kleinen Spachtelchen das Pulver in ganz kleinen Mengen in die Flüssigkeit hineingibt und für den Anfang das Schütteln vermeidet, so geht die Wasserstoffentwicklung nur ganz allmählich vor sich, und stärkere Erhitzung des Reaktionsgemisches wird mit Sicherheit vermieden. Ist die ganze Magnesiummenge eingetragen, so gießt man 5–6 ccm des Gemisches in ein weites Reagenzrohr ab, fügt erst 2 ccm Milch (am besten rohe) und dann 6 ccm eisenchloridhaltige 25%ige Salzsäure hinzu (auf 100 ccm 25%ige Salzsäure ca. 2–3 Tropfen der gewöhnlichen 10%igen Eisenchloridlösung). Nun wird erhitzt und die Flüssigkeit $\frac{1}{2}$ –1 Minute in lebhaftem Sieden erhalten. Nehmen die Flüssigkeit oder die an ihrer Oberfläche nach Beendigung des Kochens sich abscheidenden Eiweißflocken eine violette Färbung an, so ist die Anwesenheit von Ameisensäure mit aller Sicherheit bewiesen.

Die Probe fiel nun in der Tat, so oft sie angestellt wurde, positiv aus. Allerdings durften nicht zu kleine Mengen Substanz verwendet werden.

¹⁾ Proc. Cambridge Phys. Soc. 14, S. 385 (1908). Ref. Chem. Centralbl. 79, I, 1379 (1908).

Damit war also der Nachweis der Ameisensäure in den bei der Vakuumdestillation der eiweißfreien Blutauszüge erhaltenen Destillaten erbracht und dem Quecksilberchloridverfahren die nötige Sicherheit gegeben.

Es galt nun noch weiter die Frage zu prüfen: Ist die als Ameisensäure erkannte Substanz auch mit Sicherheit als ein Bestandteil des Blutes anzusehen, d. h. kommt sie wirklich als solche im Blut vor oder stellt sie ein Kunstprodukt dar, das während der langwierigen Verarbeitung des Blutes entsteht?

Diese Frage bedurfte der eingehendsten Prüfung. Wissen wir doch, daß Ameisensäure aus allen möglichen organischen Stoffen, insbesondere aber aus Zuckern bei der Destillation wäßriger Lösungen sehr leicht entsteht, und zwar vor allem dann, wenn größere Mengen von Säuren zugegen sind und die Destillation bei gewöhnlichem Druck, also bei einer Temperatur von 100° C., vorgenommen wird.

Bevor wir hierauf eingehen, möge noch eine beachtenswerte Fehlerquelle besprochen werden, die unter Umständen zu bedenklichen Täuschungen Veranlassung geben könnte. Es ist selbstverständlich, daß man sicher sein muß, daß die Substanz, nach der man sucht, nicht etwa schon in den Reagenzien enthalten ist, mit denen man arbeitet. Als ich eine Lösung von neutralem Bleiacetat (reinstes Präparat von E. Merck), die schon längere Zeit gestanden hatte, zur Anstellung eines blinden Versuchs benutzte, erhielt ich eine positive Reaktion auf Ameisensäure. Die mehrfache Prüfung von frisch angesetzten Lösungen mit Material aus demselben Gefäß der Packung ergab dagegen einen negativen Befund; ebenso war das Ergebnis der Untersuchung weiterer von Merck gelieferten Gläser mit Bleiacetat. Damit war der Beweis erbracht, daß bei längerem Stehen von Bleiacetatlösungen Formiat entsteht, und es ergab sich die Forderung, nur mit frisch bereiteten Lösungen zu arbeiten.

Was nun die mögliche Entstehung der Ameisensäure als Kunstprodukt bei der umständlichen Verarbeitung des Blutes

anlangt, so ist darauf hinzuweisen, daß die Bedingungen, unter denen dies sehr leicht der Fall ist (Wasserdampfdestillation bei gewöhnlichem Druck, stark mineralsaure Reaktion, hohe Zuckerkonzentration), hier nicht gegeben waren. Die Blutauszüge wurden bei ganz schwach mineralsaurer Reaktion (1 Tropfen 25%iger HCl auf 100 ccm Flüssigkeit) im Vakuum bei 38° C. destilliert. Die Zuckerkonzentration war anfangs außerordentlich niedrig infolge der starken Verdünnung des Blutes und überstieg nur gegen Ende der Destillation selten 1%. Immerhin Spuren von Ameisensäure konnten möglicherweise auch unter diesen Bedingungen gebildet werden.

Das wurde direkt im blinden Versuch geprüft: 30 ccm einer 0,3%igen Lösung von reinem Traubenzucker „Kahlbaum“ wurden genau in der Weise verarbeitet, als ob es sich um Blut mit der gleichen Zuckerkonzentration gehandelt hätte (zunächst Zusatz der üblichen Menge Phosphorwolframsäure und Wasser bis zum Volumen von 300 ccm, dann Entfernung der Phosphorwolframsäure mit Bleiacetat usf., wie sonst). Die Destillation im Vakuum wurde so lange durchgeführt, bis das Volumen im Destillationskolben nurmehr 10 ccm und die Zuckerkonzentration 0,9% betrug. Das Destillat wurde dann mit Soda neutralisiert, zur Trockne gebracht und der Rückstand auf Ameisensäure geprüft.

Es ergab sich bei Anstellung der Quecksilberchloridprobe in diesem Versuche eine ganz leichte hauchartige Trübung, die wohl nur auf ganz geringe Spuren von Ameisensäure zu schließen erlaubte. Immerhin mußte man bei der Art unseres Arbeitens mit der Bildung von Ameisensäure — in allerdings nur minimalen Spuren — rechnen. Offenbar sind alle Methoden, die sich mit dem Nachweis der Ameisensäure in organischem (besonders zuckerhaltigem) Material beschäftigen, mit einem kleinen Fehler behaftet. Die meisten Autoren, die sich mit Ameisensäurebestimmungen befaßt haben, weisen darauf hin. Fincke¹⁾ schlägt, um ein Urteil über die künstliche Bildung der Ameisensäure zu gewinnen, vor, in gleich großen Teilen des Destillats quantitative Bestimmungen auszuführen. Handelt es sich um präformierte Ameisensäure, so muß ihre Menge in den aufeinanderfolgenden Fraktionen abnehmen.

¹⁾ l. c.

Wir glaubten — besonders im Hinblick auf die Befunde an Diabetikern, wovon im folgenden die Rede sein wird — uns mit der Feststellung eines kleinen Fehlers zufriedengeben zu dürfen. Die möglicherweise als Kunstprodukt anzusprechenden Spuren von Ameisensäure sind für die grundsätzliche Frage ihres Vorkommens im menschlichen Blute wohl ohne Bedeutung. Bei quantitativen Bestimmungen muß man mit etwas zu hohen Werten rechnen.

Die auf Ameisensäure untersuchten Blutproben stammten von einigen normalen Individuen, von Nierenkranken und von Diabetikern. Da die Prüfung immer in der gleichen Weise mit gleichen Mengen Destillatrückstandes ausgeführt wurde, ist wohl bis zu einem gewissen Grade ein Vergleich der Ergebnisse gestattet. Freilich waren ja die der Destillation unterworfenen Blutmengen nicht gleich groß, was hierbei zu berücksichtigen ist.

Bei den untersuchten 3 Normalen (darunter ein sehr kräftiger, blühend aussehender Kollege) war die Reaktion sehr deutlich positiv, das Kalomel schied sich als weißgelblicher Niederschlag aus.

Unter den 6 Nierenkranken befanden sich 4 mit chronischer diffuser Glomerulonephritis im Stadium der Azotämie und 2 Nierensklerosen ohne Retention. Auch bei ihnen war die Probe positiv, zum Teil sogar sehr stark.

Weniger einheitlich war der Befund bei den Diabetikern (12 Fälle), die zum Teil mehrmals untersucht wurden. Zu meinem Erstaunen fiel hier die Probe ganz verschieden aus. Während bei einigen die Ausscheidung des Kalomels in ähnlicher Weise erfolgte wie bei den Normalfällen und bei den Nierenkranken, fand sich bei den anderen nur eine Spur Trübung und bei einzelnen war die Reaktion überhaupt gänzlich negativ. Das war besonders auffallend im Hinblick auf die Tatsache, daß auch im blinden Versuch eine Spur Kalomelbildung nachzuweisen war. Irgendwelche Beziehungen zwischen dem Grade der Hyperglykämie und der Stärke der Ameisensäurereaktion waren nicht mit Sicherheit

festzustellen. Ja, auffallenderweise trifft einer der negativen Befunde gerade mit dem höchsten Blutzuckerwert unter den untersuchten Fällen zusammen. Es handelte sich um einen Fall von Coma diabeticum mit einem Blutzucker von 0,483% nach Bertrand (0,486% nach Maquenne). Außer bei diesem Falle war die Ameisensäurereaktion noch bei zwei anderen völlig negativ. Hier waren die Blutzuckerwerte zwar niedriger, aber doch gegenüber der Norm deutlich erhöht (0,355% bei dem einen und 0,23% bei dem anderen). Von den beiden letzteren Fällen wurde der eine einige Wochen später nochmals untersucht und diesmal bei der Quecksilberchloridprobe eine hauchartige Trübung festgestellt. Bei dem Rest der Fälle fand sich gleichfalls nur eine hauchartige Trübung.

Diese Befunde bei Diabetikern sind in mehrfacher Hinsicht von Wichtigkeit. Zunächst einmal sprechen sie geradezu dagegen, daß die Ameisensäure bei der von uns geübten Art des Arbeitens in nennenswerter Menge als Kunstprodukt entsteht. Sonst hätte man wohl erwarten müssen, daß die stärkste Ameisensäurereaktion dort gefunden worden wäre, wo der Zuckergehalt der Destillationsflüssigkeit am höchsten war. Das war jedoch nicht der Fall, vielmehr fiel die Reaktion gerade in dem Falle von Coma diabetic. mit dem hohen Blutzuckerwert völlig negativ aus.

Das Bedenken, daß größere Mengen von Ameisensäure als Kunstprodukt auftreten, ist nach diesen Befunden wohl unbegründet, und wir dürfen die Ergebnisse unserer Untersuchungen ohne Rücksicht darauf beurteilen. Die Tatsache, daß bei Diabetikern die Ameisensäure im Blute häufig nur in Spuren oder gar nicht vorzukommen scheint, während sie bei den untersuchten Normalfällen bisher stets gefunden wurde, ist wohl so zu deuten, daß hier der Abbau des Zuckers, der sonst bis zur Ameisensäure geht, gestört ist. Wir möchten diese Deutung jedoch vorläufig nur mit aller Zurückhaltung aussprechen. Die Ameisensäure läßt sich, wie es scheint, ohne allzu große Schwierigkeiten im

Blute quantitativ bestimmen¹⁾, und so wird es möglich sein, die Frage, inwieweit der Ameisensäuregehalt des Bluts beim Diabetes von den Verhältnissen in der Norm abweicht, sicher zu entscheiden.

Mit der Vorstellung, daß die Ameisensäure als ein regelmäßiger Bestandteil des normalen Blutes zu betrachten ist, stimmen erst kürzlich von W. Autenrieth gemachte Mitteilungen²⁾ über den regelmäßigen Befund von Ameisensäure im Harn des gesunden Menschen aufs beste überein. Nach Autenrieth werden im Durchschnitt in 24 Stunden etwa 0,2 g Ameisensäure ausgeschieden. Über das Verhalten diabetischen Harns in Bezug auf Ameisensäure liegen zuverlässige Angaben aus neuerer Zeit anscheinend nicht vor.

Über den Befund von Ameisensäure im menschlichen Blute finden sich in der älteren Literatur nur ganz spärliche Angaben: Salkowski wies schon vor 50 Jahren im Blute eines an Leukämie verstorbenen Mannes einen bei saurer Reaktion flüchtigen Silbernitrat reduzierenden Körper nach³⁾. Später hat man, offenbar unter dem Eindruck, daß bei der Hitzeoagulation sehr leicht Ameisensäure als Kunstprodukt entstehe, nach diesem Körper im Blute nicht mehr gesucht.

¹⁾ Untersuchungen darüber sind zurzeit im Gange.

²⁾ Münchn. Med. Wochenschrift Jahrg. 1919, Nr. 31, S. 862.

³⁾ Virchows Archiv Bd. 50, S. 174 (1870).