

Mikroreduktionsbestimmung.

Von

Dr. D. G. Cohen Tervaert.

(Aus dem Physiologisch-chemischen Laboratorium der Universität Utrecht,
Direktor Professor Dr. W. E. Ringer.)
(Der Redaktion zugegangen am 20. März 1920.)

I. Die Kupfermethode Bangs.

Ivar Bang hat kurz vor seinem Tode einige Abänderungen seiner bekannten Mikromethode zur Bestimmung der Reduktion des Blutes veröffentlicht¹⁾. Die frühere direkte Titrierung des entstandenen Kuprosalzes ist von einer indirekten ersetzt worden, indem nach Zugabe von Jodat und Schwefelsäure ein Teil der ersteren vom Kuprosalze reduziert wird und der Rest jodometrisch (nach Zusetzen von Kaliumjodid) zurücktitriert wird²⁾. Es wird so der Einfluß des Luftsauerstoffes ausgeschaltet, der früher bei der alkalischen Reaktion das Kuprosalz zum Teile wieder oxydierte; das ziemlich umständliche Einleiten von Kohlensäure ist also jetzt überflüssig. Zweitens würde aber jetzt nach Bang die Dauer des Kochens, wenn sie nur nicht zu kurz genommen

¹⁾ Biochem. Zeitschr. Bd. 87, S. 248 und Bd. 92, S. 344 (1918).
Ivar Bang und R. Hatlehoel, ebenda Bd. 87, S. 264 (1918).

²⁾ Bang sagt nicht, daß Mc. Lean als erster die Jodsture zu diesem Zwecke empfohlen hat. Vor kurzem hat Mc. Lean eine genau ausgearbeitete Methode zur Mikrobestimmung des Blutzuckers beschrieben, die auf diesem Prinzip beruht und sich in unserem Laboratorium ausgezeichnet bewährte. — Siehe Hugh Mc. Lean, The Biochemical Journal Bd. 13, S. 135 (1919); R. Bahlmann, Nederlandsch Tijdschrift voor Geneeskunde 1920 (I).

wird, ohne Einfluß sein. Das regelmäßige Kochen wurde mittels Dampfdurchleitung gefördert.

Ich habe nun diese abgeänderte Methode geprüft und bin zu folgenden Schlüssen gekommen:

Nur mit Innehaltung einer bestimmten Erhitzungszeit bekommt man brauchbare Resultate. Es sind weiter noch einige kleinere Abänderungen zu empfehlen.

In der Methodik und der Herstellung der Lösungen folgte ich den Angaben Bangs genau nach, wie er es in der letzten Mitteilung vorschreibt. Das Jodat wurde der Kupfersulfatlösung zugesetzt und nicht zusammen mit der Schwefelsäure am Ende der Erhitzung zugefügt, weil die genaue Abmessung dann etwas schwierig ist. Statt Schwefelsäure setzte ich aber Salzsäure zu. Man bekommt dann keinen Niederschlag (wahrscheinlich Uranylsulfat), der die Titration erschwert.

Die Lösungen waren also folgende:

- | | | |
|-----------------------------------------|-------------------------------------------------|----------------------|
| I. Extraktionslösung: | Kaliumchlorid (Kahlbaum oder Merck) | 160 g, |
| | Uranylacetat | 1,5 g, |
| | 25%ige Salzsäure | 0,75 ccm, |
| | Wasser bis auf | 1000 ccm. |
| II. Kupfersulfat-Jodlösung: | Kupfersulfat | 2,5 g, |
| | Kaliumjodat | 0,360 g, |
| | 20%ige Schwefelsäure (oder Salzsäure) | 10 ccm ¹⁾ |
| | Wasser bis auf | 1000 ccm. |
| III. Alkali-Lösung: | Kaliumkarbonat | 75 g, |
| | Seignettesalz | 20 g, |
| | Wasser bis auf | 1000 ccm. |
| IV. Salzsäure 15%. | | |
| V. Kaliumjodidlösung 5% ²⁾ , | | |
| VI. N/100-Natriumthiosulfat. | | |

Die Bestimmung geschah dann in folgender Weise. Ein Papierstückchen wurde mittels der Hartmann- und Braun-

¹⁾ Zur Erhöhung der Haltbarkeit.

²⁾ Mittels Queckeilber jodfrei gehalten.

schen Mikrotorsionswaage gewogen¹⁾, mit Zuckerlösung oder Blut getränkt, wiederum gewogen und in einem weiten kurzen Reagenzrohr mit 6,5 ccm der Lösung I während 30 Minuten extrahiert. Die Flüssigkeit wurde dann in einen Erlenmeyer-Kolben abgegossen, es wurde mit 6,5 ccm der Lösung I nachgespült und sämtliche 13 ccm zur Bestimmung benutzt. In den Blindversuchen wurden ohne Extraktion sofort 13 ccm der Lösung I genommen, weil es sich wiederholt zeigte, daß die Papierchen keine reduzierenden Stoffe enthielten.

Zu den 13 ccm wurden dann 2 ccm der Lösung II und 2 ccm der Lösung III zugesetzt und mittels der von Bang angegebenen Vorrichtung durch dieses Gemisch Dampf durchgeleitet. Nach bestimmter Zeit wurden dann 2 ccm Salzsäure hinzupipettiert, der Kolben gesenkt, das Dampfrohr abgespült während noch Dampf hinauskam, und der Kolben unter dem Dampfrohr fortgenommen. 5 Minuten nach der Ansäuerung wurde in Wasser gekühlt, 25 ccm destilliertes Wasser und 1 ccm Kaliumjodidlösung zugesetzt und das entstandene Jodium mittels Thiosulfat und Stärke²⁾ titriert.

Zur Erhaltung guter Resultate soll man für Blindversuche ohne Zucker immer den gleichen Wert finden. Dies gelang mir nun anfangs nicht. Nach langem Suchen fand ich, daß genau wie früher die Erhitzungszeit die Werte beeinflusst. Nur wenn ich den Anfang der Dampfdurchleitung mittels einer Kontrolluhr markierte und eine bestimmte Zeit später ansäuerte, waren für dieselbe Erhitzungszeit die Werte gleich. Auch das Kochen des Wassers im Kochkolben sollte gleich stark sein. Die Werte stiegen an mit der Dauer der Erhitzung, wie es Tabelle I zeigt. Als ich den Anfang des Kochens statt der Erhitzung markierte, waren die Werte wechselnd, wahrscheinlich wegen der Unmöglichkeit, den Anfang des Kochens scharf festzustellen.

¹⁾ Ich habe hierzu die Papierchen durchbohrt und sie an einen Aluminiumhaken an der Waage aufgehängt. Dies geht schneller als der Gebrauch der Stahlklemme.

²⁾ Die Stärke war eine Lösung von Amylum solubile und Kaliumchlorid, wie Bang empfiehlt.

Tabelle I (Einfluß der Erhitzungszeit).

Erhitzungszeit in Minuten	ccm Thio- sulfat 0,00563 N	Geschwindigkeit der Durchleitung
0	3,754	—
0	3,758	—
1	3,294	schnell
1	3,316	"
1	3,383	mäßig schnell
1	3,426	langsam
2	3,347	mäßig schnell
2	3,385	" "
3	3,399	" "
3	3,418	" "
4	3,442	" "
4	3,442	" "
4	3,424	" "
4	3,430	" "
4	3,450	" "
4	3,454	" "
4	3,457	" "
5	3,465	" "
5	3,470	" "
6	3,495	" "
6	3,499	" "

Es folgt aus dieser Tabelle, daß man sich eine bestimmte Erhitzungszeit wählen soll. Bang selber ist hierüber eigentlich nicht klar. Z. B. sagt er S. 267¹⁾: „... die Reduktionswirkung war bei Schwankungen der Kochzeit von 2—6 Minuten ganz unverändert“, und S. 271¹⁾: „Man markiert mittels einer Sanduhr den Anfang der Erhitzung... Wenn 4 Minuten vergangen sind, läßt man aus einer Pipette 2 ccm 20%ige Schwefelsäure in die Flüssigkeit einlaufen...“.

Ich wählte mir dann ebenfalls eine Erhitzungszeit von 4 Minuten und machte eine Reihe Bestimmungen zur Erhaltung des Reduktionswertes von Glukose unter den gegebenen Bedingungen. Die Glukoselösungen waren 0,1%ige. Wiederholte Bestimmungen mittels Bertrands vorzüglicher Methode

¹⁾ Bd. 87.

ergaben einen Gehalt der gebrauchten Glukose zu 96,5%.
Folgende Tabelle gibt die Resultate:

Tabelle II (Bestimmung des Reduktionswertes von Glukose).

Nr.	Ausgangsmenge in mg Glukose	ccm n/100-Thiosulfat für 1 mg Glukose
1	0,117	2,12
2	0,128	2,30
3	0,069	2,20
4	0,134	2,19
5	0,129	2,37
6	0,109	2,36
7	0,077	2,27
8	0,080	2,27
9	0,135	2,00
10	0,068	2,29
11	0,139	2,17
12	0,099	2,15
		Mittel 2,22

Dieser Mittelwert ist also der Faktor zur Berechnung einer unbekanntem Glukosemenge. Zur näheren Prüfung desselben wurde folgende Versuchsreihe angestellt:

Tabelle III (nähere Prüfung des Faktors 2,22).

Nr.	Ausgangsmenge in mg Glukose	Mittels Faktor 2,22 gefunden mg Glukose	ccm n/100-Thiosulfat für 1 mg Glukose
1	0,38	0,40	2,32
2	0,63	0,73	2,59
3	0,45	0,49	2,43
4	0,52	0,57	2,39
5	0,33	0,38	2,52
6	0,29	0,33	2,49
7	0,49	0,47	2,14
8	0,27	0,26	2,09
9	0,47	0,47	2,23
10	0,27	0,26	2,11
11	0,30	0,29	2,12

Der Mittelwert 2,22 ccm n/100-Thiosulfat oder Jod für 1 mg Glukose stimmt überein mit einer früheren Angabe Bangs¹⁾. In einer, soviel ich weiß nicht offiziell publizierten, Reduktionstabelle steigt der Faktor aber umgekehrt mit der Glukosemenge von 2,24—3,00 an; 1918 aber²⁾ sagt er: „Der Faktor 2,8 entspricht der Reduktion für 0,01 mg Glukose, die, wie ersichtlich, überall ganz konstant ist.“

Weiter wurde die Brauchbarkeit der Methode für Blut untersucht. Es wurde hierzu der Reduktionswert des mit Oxalat versetzten Blutes vor und nach Zugabe einer bestimmten Glukosemenge festgestellt.

Tabelle IV (Prüfung für Blut).

Reduktionswert des Blutes in ‰ Glukose vor Glukosezugabe:		Reduktionswert des Blutes in ‰ Glukose nach Glukosezugabe:	
		Gefunden:	Berechnet:
I.	{ 0,69 0,81	{ 2,36 2,31	2,44
II.	{ 0,64 0,67 0,59	{ 1,04 0,95	1,17
III.	{ 0,64 0,67 0,59	{ 1,31 1,30	1,48

Wie gesagt, ist neuerdings eine bequemere Methode von H. Mc. Lean beschrieben worden. Vielleicht kann das Mitgeteilte anderen nützlich sein.

II. Kaliumbichromatmethode.

1916 ist von Bang³⁾ ein Verfahren zur Mikrobestimmung des Blutfettes angegeben. Er hat aber dieses Verfahren verlassen und 1918 ein anderes mitgeteilt⁴⁾. Die neue Methode

¹⁾ Biochem. Zeitschr. Bd. 49, S. 25 (1913).

²⁾ Biochem. Zeitschr. Bd. 87, S. 268 (1918).

³⁾ Methoden zur Mikrobestimmung einiger Blutbestandteile (Bergmanns Verlag 1916, S. 48).

⁴⁾ Biochem. Zeitschr. Bd. 91, S. 86 (1918). Die weitere Reihenfolge

beruht auf dem Befunde, daß ein Gemisch von Kaliumbichromat und Schwefelsäure, wie es zur Entfettung des Glasgeschirres benutzt wird, zu Fettbestimmungen brauchbar ist, da die Oxydation regelmäßig verläuft. Schon sagt Bang, daß auch andere Stoffe wie Glukose in derselben Weise bestimmt werden können, und daß 0,1 mg Traubenzucker 0,143 ccm n/10-Chromsäure braucht.

Im Anschluß an die vorige Arbeit habe ich die Brauchbarkeit der Chromsäure für Glukosebestimmungen geprüft, da sie vielleicht die Technik vereinfachen könnte. Ich habe mich dabei soviel als möglich an Bangs Vorschrift zur Fettbestimmung gehalten. Sie ist aber nicht genau präzisiert. Dem isolierten Fette wird 1 ccm n/10-Kaliumbichromat und 5 ccm konzentrierte Schwefelsäure zugegeben. Schlägt die Farbe in Grün um, so soll mehr Bichromat und, falls mehr als 2 ccm desselben gebraucht sind, auch mehr Schwefelsäure zugesetzt werden. $\frac{1}{4}$ Stunde oder länger wird die Mischung, die nicht erwärmt oder abgekühlt werden soll, sich selbst überlassen, dann aus dem mit Wasser angefüllten „Proberöhrchen“ in ein Becherglas übergeführt, mit Wasser bis zu 100—150 ccm angefüllt und nach Zugabe von Kaliumjodid das entstandene Jodium titriert. Mittels einer empirisch gefundenen Zahl berechnet man die Menge des Fettes. Ich habe nun diese Anordnung auf Glukose übertragen, indem ich statt des Fettes 0,2—0,4 ccm 1‰ige Glukoselösung zusetzte. Das n/10-Thio-sulfat befand sich in einer Mikrobürette mit Hebereinrichtung. Immer war von 0,4 ccm Zuckerlösung 2mal soviel Chromsäure als von 0,2 ccm reduziert worden. Es stieg aber nach längerem Stehen die von derselben Glukosemenge reduzierte Chromsäuremenge an. So hatte 0,2 ccm Glukoselösung verbraucht:

Nach 15 Minuten	0,166 ccm	n/10-Chromsäure,
" 20 "	0,208	" "
" 30 "	0,225	" "
" 18 Stunden	0,262	" "

der betreffenden Mitteilungen sollte sein: Ebenda Bd. 91, S. 235; über Lipämie I Bd. 90, S. 383; II u. III Bd. 91, S. 104 u. 111; IV Bd. 91, S. 224; über Cholesterinämie Bd. 91, S. 122.

Auch Schütteln des Kolbens (ich verwendete Erlenmeyer-Kolben von 100—150 ccm) hatte Einfluß auf die Reduktionszahl.

Es zeigte sich also die Notwendigkeit, die Reaktionsbedingungen genauer festzustellen, zu gleicher Zeit aber doch auch die Brauchbarkeit der Methode. Ich prüfte also den Einfluß der Reaktionsdauer, der Temperatur, des Volums und der Säuremenge. Letztere drei Faktoren hängen miteinander zusammen, indem in der Bangschen Anordnung die Erhitzung von der Schwefelsäurezugabe gefördert wird und also auch vom Volum abhängt. Wenn man dann das Gefäß bei Zimmertemperatur $\frac{1}{4}$ Stunde oder länger sich selbst überläßt, wird der Verlauf der Temperatur des Gemisches schwanken je nach Form und Größe des Gefäßes und der Temperatur der Umgebung.

Ich habe also die Temperatur konstant gehalten mittels eines Wasserbades und nachgegangen, bei welcher Temperatur und welchem Säuregrad die Reduktion der Erwartung am besten entsprach. Ich fand dann schon bei einer Schwefelsäurezugabe von 2 ccm auf einem Totalvolum von 8 ccm nach $\frac{1}{2}$ Stunde eine konstante Reduktionszahl für 1 mg Glukose. Als ich aber die Schwefelsäuremenge bis auf 4 ccm erhöhte, war die Reduktionszahl ein wenig höher und den theoretischen Verhältnissen am nächsten. Eine weitere Erhöhung der Schwefelsäuremenge erhöhte die Reduktionszahl nicht mehr. Aus der Annahme, daß der Zucker von der Chromsäure zu Kohlensäure und Wasser oxydiert wird, folgt, daß 0,1 mg Zucker von 0,133 ccm n/10-Chromsäure angezeigt wird und die Angabe Bangs, nach welcher 0,1 mg Glukose 0,143 ccm n/10-Chromsäure braucht, kann kaum genau sein¹⁾.

Eine Temperatur von 90° war für die Reaktion genügend. Eine höhere Temperatur änderte die Zahlen nicht mehr, bei einer niedrigeren Temperatur aber waren die Zahlen niedriger.

¹⁾ Biochem. Zeitschr. Bd 91, S. 103 (1918).

Untenstehende Tabellen zeigen den Einfluß der Schwefelsäuremenge und der Temperatur.

Tabelle V (Einfluß der Schwefelsäuremenge).

Schwefelsäure ccm	ccm n/10- Chromsäure für 0,1 mg Glukose	Temperatur Grad
2	0,107	87—93
2	0,101	87—93
3	0,114	87—93
4	0,124	87—93
5	0,118	87—93

Tabelle VI (Einfluß der Temperatur).

Temperatur Grad	ccm n/10- Chromsäure für 0,1 mg Glukose	ccm Schwefel- säure
80	0,085	2
80	0,061	2
85—90	0,100	2
85—90	0,092	2
87—93	0,124	4
87—98	0,122	4
87—93	0,120	4
98	0,123	4
98	0,121	4

Ich führte demnach die Bestimmung wie folgt aus: In einen 100 ccm-Erlenmeyer-Kolben wurde die zu untersuchende Flüssigkeit mit einer bestimmten Menge n/20-Kaliumbichromatlösung und Wasser bis zu 6 ccm gemischt. Dann wurden 4 ccm Schwefelsäure zugesetzt und der Kolben im Wasserbade von 90° C. während genau 30 Minuten erhitzt. Dann wurde in Wasser abgekühlt, 50 ccm destilliertes Wasser und 1 ccm 5% ige Kaliumjodidlösung zugesetzt und 1 Minute später mittels Thiosulfat titriert. Es wurden daneben meistens

zwei Blindversuche angestellt. Die Differenz der Titrationszahlen gab den Reduktionswert der untersuchten Flüssigkeit.

Die Bestimmung der Normalität des Thiosulfats geschah auf verschiedene Weise:

I. Mittels $n/20$ -Jodlösungen:

A. Aus einer bekannten Säuremenge und Übermaß Kaliumjodid¹⁾ hergestellt.

B. Mittels einer bekannten Menge Kaliumbichromat und Übermaß Jodid und Schwefelsäure. Man gebe hier zu einem Gesamtvolum von 50 ccm 2 ccm konzentrierte Schwefelsäure hinzu.

II. Ebensogut und bequemer kann man ausgehen von der haltbaren $n/20$ -Bichromatlösung. Man mischt 2 ccm derselben mit 0,1—0,2 ccm konzentrierter Schwefelsäure und 1 ccm 5%igem Kaliumjodid und füllt nach 1 Minute mit 50 ccm Wasser an. Nur in dieser Anordnung ist die Bichromatlösung für die Bestimmung der Normalität brauchbar. Wenn man aber 2 ccm $n/20$ -Bichromat, 50 ccm Wasser und 1 ccm 5%iges Jodid gleich am Anfange mischt, braucht man 2 ccm Schwefelsäure, um nach 1 Minute die Jodentwicklung beendet zu haben. Man hat dann aber mehr Jod frei, als 2 ccm $n/20$ entspricht, z. B.:

I. Die Menge Jod in letzterer Weise entwickelt	}	2,349 ccm Thiosulfat	
entspricht		2,367	
II. Die Menge Jod aus 2 ccm $n/20$ -Bichromat,	}	2,293	
0,15 ccm Schwefelsäure, 1 ccm Jodid u. 50 ccm		2,309	
Wasser nach 1 Minute entspricht			
III. Die Menge Jod aus 2 ccm $n/20$ -Jodlösung mittels	}	2,318	
Säure, Jodat und Jodid hergestellt, entspricht		2,312	
IV. Die Menge Jod aus 2 ccm $n/20$ -Jodlösung aus	}	2,308	
Bichromat, Jodid und Schwefelsäure herge-		2,305	
stellt, entspricht			

Im ersteren Falle ist also mehr Jod entwickelt. Es stammt dies zum Teile daher, daß schon in einem Gemische von 2 ccm Schwefelsäure, 50 ccm Wasser und 1 ccm 5%igem Jodid ein

¹⁾ Man achte darauf, daß die Angabe Bangs (Methoden zur Mikrobestimmung S. 46, 1916) für das Jodat kaum zureichend ist und nur für eine $n/200$ -Lösung gilt.

wenig Jod freikommt. Ich konnte diesem weder durch Kohlensäureüberleitung noch durch Auskochen des Wassers vorbeugen. Dazu gab Schwefelsäure verschiedener Herkunft eine verschiedene Menge Jod. Ein Spezimen von Merck gab die geringste Jodentwicklung.

Wenn man zu einem gleichen Gemisch von Schwefelsäure, Wasser und Jodid noch Chromsäure zusetzt, ist der Mehrbetrag an Jodium über der aus der Chromsäure erwarteten Menge höher, als dies der Schwefelsäure entspricht. Man hat hier die Anordnung des Blindversuchs, allein ohne Erhitzung. Aus der Differenz zwischen diesem und einem Versuch mit Erhitzung berechnet man also die Reduktion der Reagentien in der Hitze, nicht aus der Differenz mit der Menge Jod, die der Normalität der Chromsäure entspricht.

Die Beschaffenheit der Luft beeinflusst die Werte erheblich. So fand ich z. B., daß Tabakrauch die Blindwerte bedeutend verringert:

Tabelle VII (Einfluß der Zusammenstellung der Luft).

I.	Blindversuch ohne Rauch	} 2,292 ccm Thiosulfat 2,279
II.	Rauch am Kolben vorbeigeblasen	
III.	Rauch in den Kolben hineingeblasen	1,820
IV.	Mit Gummistöpsel geschlossen	2,205
V.	Mit Gummistöpsel geschlossen	2,252

Es ist also unzweckmäßig, die Kolben mit Stöpsel zu schließen. Es fallen dann immer Partikel hinein, die mitreagieren.

Gerade wegen des Einflusses der Luftzusammenstellung stelle man immer neben den Bestimmungen Blindversuche an.

Tabelle VIII gibt die Anwendung der Methode auf Lösungen von Traubenzucker, Milchzucker und Malzucker. Es wurden von jedem Zucker zwei Lösungen hergestellt, deren Gehalt nach Doppelbestimmungen mittels Bertrands Verfahren festgestellt wurde. Die sechste Spalte zeigt die aus jeder Bestimmung berechnete Menge n/10-Chromsäure für 0,1 mg des Zuckers:

Tabelle VIII (Anwendung der Methode auf Zuckerlösungen).

Art des Zuckers	% Gehalt nach Bertrand	Bichromat-Methode				
		Gebrauchte ccm-Lösung	mg Zucker	ccm Thiosulfat weniger als im Blindversuch	Normalität	ccm n/10-Chromsäure für 1 mg Zucker
Glukose	{ 0,987 0,988	0,2	0,198	0,570	0,04318	0,124
		0,4	0,395	1,118	0,04318	0,122
		0,6	0,593	1,646	0,04318	0,120
	{ 1,953 1,968	0,1	0,197	0,566	0,04271	0,123
		0,15	0,295	0,810	0,04271	0,117
		0,3	0,590	1,737	0,04318	0,127
		0,5	0,983	2,866	0,04318	0,126
		0,8	1,572	4,463	0,04318	0,123
				Mittel	0,123	
Laktose	{ 1,795 1,806	0,1	0,180	0,577	0,04301	0,138
		0,2	0,360	1,127	0,04301	0,135
		0,4	0,720	2,173	0,04301	0,130
	{ 1,797 1,799	0,6	1,079	3,338	0,04271	0,132
		0,8	1,438	4,313	0,04271	0,128
						Mittel
Maltose	{ 1,713 1,717	0,1	0,172	0,525	0,04271	0,130
		0,2	0,343	1,079	0,04271	0,134
	{ 2,533 2,541	0,4	1,015	3,227	0,04271	0,136
		0,6	1,522	4,759	0,04271	0,134
						Mittel

Die Werte für Laktose und Maltose entsprechen also der Annahme, daß der Zucker bis zu Kohlensäure und Wasser oxydiert wird; die Werte für Traubenzucker sind etwas niedriger.

Ich habe weiter die Brauchbarkeit der Methode zur Blutreduktionsbestimmung untersucht. Zur Extraktion des Blutes eignet sich bei dieser Methodik die Bangsche Kaliumchloridlösung nicht. Es kommt daraus nach Zusetzung der Schwefelsäure eine große Menge Salzsäure frei, die zum Teil von der Chromsäure oxydiert wird. Daß aber eine Menge Chlorionen, wie sie im Blute vorkommen, nicht stört, beweist folgender Versuch:

Blindversuch	0,979 ccm Thiosulfat	0,0982 N,
+ 0,2 ccm 0,6% KCl	1,010	" " 0,0982 N,
+ 0,2 " 0,6% KCl	1,008	" " 0,0982 N.

Folgende Lösung eignet sich zu der Methodik und der Extraktion:

- 0,5% Phosphorwolframsäure (Merck),
 2 % Natriumsulfat pro Analysin¹⁾,
 0,2% Schwefelsäure.

Mischt man 24 ccm der Lösung mit 1 ccm Blut, so bekommt man nach Absetzung des Eiweißniederschlags ein farbloses klares Filtrat, das eine fast negative Xanthoproteinreaktion gibt. Zu der Bestimmung kann man dann 4—5 ccm des Filtrates benutzen. Man kann auch mit Blut getränkte Papierstückchen mittels der Lösung extrahieren und bekommt dann ebenfalls ein klares Filtrat²⁾, was mit der Bangschen Lösung, namentlich wenn das Blut flüssig gehalten ist, nicht immer der Fall ist. Oxalat wird von Chromsäure oxydiert und ist also zur Flüssighaltung nicht geeignet. Harnstoff wird von Chromsäure nicht weiter oxydiert:

Blindversuch wie oben	0,979 ccm Thiosulfat	0,0982 N.
+ 5 ccm 1‰ige Harnstofflösung	1,006 " "	0,0982 N.
+ 5 ccm 1‰ige " "	0,997 " "	0,0982 N.

Folgende Tabelle gibt die Resultate mit Blut erhalten vor und nach Zugabe von Glukose:

Tabelle IX (Anwendung auf Blut).

	Reduktion in ‰ Glukose		berechnet
	vor Glukose-zugabe	nach Glukose-zugabe	
I. Defibriniertes Pferdeblut	{ 0,87 ³⁾ 0,92	—	—
II. Dasselbe Blut nach 24 Std.	{ 1,50 ³⁾ 1,50	{ 2,33 2,27	2,44
III. Defibriniertes Pferdeblut	{ 1,69 1,71	{ 2,25 2,21	2,03
IV. Blut aus dem Finger . .	{ 1,70 1,49	—	—

¹⁾ Das gewöhnliche Natriumsulfat enthielt viel reduzierende Stoffe.

²⁾ Man filtriere von etwaigen kleinen Blutgerinnsel ab.

³⁾ 2 ccm Schwefelsäure gebraucht.

In dem vierten Versuche wurde das Blut tropfenweise in ein mit 15 ccm der Extraktionslösung beschicktes Gefäßchen aufgefangen, das vorher und nachher gewogen wurde. Das Filtrat war vollkommen klar und farblos. Dieser Versuch wurde angestellt, weil die anderen mit altem Blute ausgeführten Bestimmungen einen höheren Reduktionswert zeigten, als den Kupfermethoden entspricht. Der zweite Versuch zeigte, daß beim Stehen der Gehalt an reduzierenden Stoffen im Filtrat angestiegen war, was kaum einer Vermehrung des Glukosegehaltes zuzuschreiben ist. Im frischen Blute der völlig normalen Versuchsperson waren die Verhältnisse aber dieselben.

Schlüsse.

1. Das abgeänderte Bangsche Verfahren zur Bestimmung des Blutzuckers ist nur bei einer bestimmten Erhitzungszeit brauchbar.
2. Zur Bestimmung von Glukose, Laktose und Maltose wird eine einfache Methode (Oxydation mittels Chromsäure) beschrieben.
3. Die Reduktion des Blutes ist nach diesem Verfahren höher als mit den üblichen Kupfermethoden. Zugewetzten Zucker findet man im Blute quantitativ zurück.