

## Zur Methodik der quantitativen Traubenzuckerbestimmung des Blutes.

Von

Berthold Oppler, Göttingen.

(Der Redaktion zugegangen am 22. Januar 1910)

In einer früheren Mitteilung gemeinsam mit P. Rona<sup>1)</sup> wurde über Versuche berichtet, im Blute, welches mit Hilfe der «Eisenmethode» von P. Rona und L. Michaelis zuvor entweißt worden war, den Zuckergehalt durch Polarisation und gleichzeitige Reduktion nach dem Verfahren von Bang<sup>2)</sup> zu bestimmen. Der weiteren Anwendung des geübten Verfahrens mußte, da inzwischen die Zuverlässigkeit der Bangschen Methode von Funk<sup>3)</sup> bestritten worden war, trotz Andersens<sup>4)</sup> Abwehr eine Prüfung am Blute vorausgehen.

Die erforderlichen Lösungen wurden unter genauer Befolgung der von Jessen-Hausen<sup>5)</sup> und von Andersen<sup>6)</sup> gegebenen Vorschriften hergestellt und auf ihre Richtigkeit geprüft. Es entsprachen

50 ccm der blauen Lösung bei Zimmertemperatur genau 50 ccm der Hydroxylaminsulfatlösung. Der Farbenumschlag erfolgte scharf.

Die folgenden 2 Analysen wurden als blinder Versuch mit Wasser an Stelle einer Zuckerlösung vollständig durchgeführt.

10 ccm H<sub>2</sub>O + 50 ccm blaue Lösung erfordern 49,4 ccm weiße Lösung, Umschlag scharf.

<sup>1)</sup> Bioch. Zeitschrift, Bd. XIII, S. 121.

<sup>2)</sup> Bioch. Zeitschrift, Bd. II, S. 271; Bd. VII, S. 327.

<sup>3)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. LVI, S. 507.

<sup>4)</sup> Bioch. Zeitschrift, Bd. XV, S. 76.

<sup>5)</sup> Bioch. Zeitschrift, Bd. X, S. 249.

<sup>6)</sup> Bioch. Zeitschrift, Bd. XV, S. 76.

10 ccm  $H_2O$  + 50 ccm blaue Lösung erfordern 50,6 ccm weiße Lösung, Umschlag scharf.

Daraus ergibt sich als Mittelwert, daß 50 ccm der blauen Lösung genau 50 ccm der weißen Lösung zu ihrer Entfärbung brauchen, die Lösungen also als richtig gelten müssen.

Nach genügender Prüfung des Verfahrens an reinen Zuckerlösungen, wobei eine hinreichende Genauigkeit sich ergeben hatte, konnte die Bestimmung am Blute in Angriff genommen werden. Zur Untersuchung diente das Sammelblut von 4 Hunden, welches bei der früheren Untersuchung gewonnen worden war. Die nach der «Eisenmethode» mit Magnesiumsulfat als Flockungsmittel erhaltenen, schwach essigsäuren Lösungen waren durch Chloroformzusatz vor Zersetzung geschützt worden und hatten, wie mehrfache Untersuchungen zeigten, ihren Drehungswinkel  $\alpha = + 0,22^\circ$  in 3 Monaten nicht geändert. Nach Verjagen des Chloroforms im Vakuum hinterblieb eine schwach gelbliche Lösung, deren Zuckergehalt polarimetrisch zu 0,35% mehrfach bestimmt wurde. War demnach der wahre Zuckergehalt der Lösung auch nicht bekannt, so konnte doch, da eine Konzentrationsänderung durch Wasserzusatz in gleichem Verhältnisse die rechtsdrehende wie die reduzierende Substanz treffen mußte, ein Verdünnungsversuch über die Brauchbarkeit des Verfahrens Aufschluß verschaffen. Dem entspricht die Anordnung der folgenden Versuche.

#### Versuch I.

a) 7 ccm Blut (0,35% Zucker) + 3 ccm  $H_2O$  erfordern 19,9 ccm weiße Lösung = 30,4 mg Zucker;

b) 7 ccm Blut (0,35% Zucker) + 3 ccm  $H_2O$  erfordern 19,8 ccm weiße Lösung = 30,5 mg Zucker;

c) 7 ccm Blut (0,35% Zucker) + 3 ccm  $H_2O$ : polarimetrisch untersucht,  $\alpha = + 0,26^\circ$ .

Der Zuckergehalt beträgt demnach nach Bang 30,5 mg Zucker  
 » » » polarimetrisch 26,0 » »

» aus der Stammlösung berechnet 24,5 » »

Zum folgenden Versuch diente die Lösung des Versuches I c.

### Versuch II.

a) 4 ccm Blut (0,26% Zucker) + 6 ccm H<sub>2</sub>O erfordern 40,3 ccm weiße Lösung = 8,2 mg Zucker:

b) 5,5 ccm Blut (0,26% Zucker) + 4,5 ccm H<sub>2</sub>O erfordern 40,2 ccm weiße Lösung = 8,3 mg Zucker.

Der aus I c berechnete Zuckerwert verlangt für

a: 12,2 mg Zucker = 36,2 ccm weiße Lösung:

b: 16,8 „ „ = 31,7 „ „ „

### Versuch III.

a) 10 ccm Blut (0,35% Zucker) erfordern 9,9 ccm weiße Lösung = 43,2 mg Zucker;

b) 10 ccm Blut (0,35% Zucker) erfordern 9,4 ccm weiße Lösung = 44,3 mg Zucker:

c) 10 ccm Blut (0,35% Zucker) polarimetrisch untersucht,  $\alpha = + 0,35^{\circ}$ .

Der Zuckergehalt beträgt demnach nach Bang	43,3 mg Zucker
„ „ „ polarimetrisch	35,0 „
„ aus I a und b für die Bestimmung nach Bang berechnet	43,4 „

### Versuch IV.

a) 4 ccm Blut (0,35% Zucker) + 6 ccm H<sub>2</sub>O erfordern 40,8 ccm weiße Lösung = 7,8 mg Zucker:

b) 4 ccm Blut (0,35% Zucker) + 6 ccm H<sub>2</sub>O erfordern 38,2 ccm weiße Lösung = 10,2 mg Zucker:

c) 4 ccm Blut (0,35% Zucker) + 6 ccm H<sub>2</sub>O: polarimetrisch untersucht,  $\alpha = + 0,16^{\circ}$ .

Der Zuckergehalt beträgt demnach nach Bang	9 mg Zucker
„ „ „ polarimetrisch	16 „
„ aus I a und b berechnet nach Bang	17,4
„ „ I c „ polarimetrisch	14,0

Diese Versuche zeigen in ganz eindeutiger Weise, daß die durch Polarisation erhaltenen Werte innerhalb enger, im Fehlerbereich der Methode liegender Grenzen eine genügende

Übereinstimmung zwischen erhaltenen und berechneten Zahlen aufweisen. Die nach der Methode Bangs erhaltenen Werte haben dagegen zu einem einheitlichen Ergebnis nicht geführt. Während Versuch Ia und b, sowie Versuch IIIa und b. eine recht gute Übereinstimmung der jeweils zusammengehörigen Analysen sowohl untereinander, wie auch mit den polarimetrisch ermittelten Werten aufweisen, hat die Methode in den Versuchen II und IV zu keinem brauchbaren Ergebnis geführt. Eine Hauptschwierigkeit des Bangschen Verfahrens besteht darin, daß der bei Verwendung reiner Traubenzuckerlösungen durch Farbumschlag hinreichend scharf bestimmbare Endpunkt der Titration einem unscharfen Umschlag weicht, sobald die wässrige Zuckerlösung durch eine, in der angewandten Verdünnung an sich farblose Blutzuckerlösung ersetzt wird. An Stelle des Farbumschlags von blau nach farblos tritt allmählich eine gelbgrüne Zwischenfärbung auf. Hinzu kommt noch, daß das Ergebnis stark von der Titrationsdauer abhängt. Es bedarf großer Übung, um bei unbekanntem Zuckergehalt die richtige Zeit einzuhalten.

Weiterhin machte sich die mangelnde Haltbarkeit der Hydroxylaminsulfatlösung (Kahlbaum) störend geltend. Schon nach drei Wochen etwa schied sich aus der in gut verschlossener, brauner Flasche aufbewahrten Lösung ein flockiger Niederschlag ab: ein gleichzeitig auftretender Geruch nach Schwefelwasserstoff zeigte die Zersetzung der Lösung an. Damit verliert aber die Methode an Bequemlichkeit.

Wenn demnach auch hervorgehoben werden muß, daß bei hinreichender Übung die Bestimmung des Zuckers in reiner, wässriger Lösung sehr scharf gelingt und auch das relative Mengenverhältnis der rechtsdrehenden zu den reduzierenden Substanzen des Blutes sich gut bestimmen läßt, wenn die absolute Menge der letzteren auf Traubenzucker bezogen nicht unter etwa 20 mg sinkt, so nahmen wir trotzdem von einer weiteren Anwendung des Verfahrens Abstand. Denn wie die späteren Versuche bestätigten, mußte unter Umständen mit der Anwesenheit äußerst geringer Mengen an reduzierender Substanz gerechnet werden. Eine einzige Titrierung auf einen

unscharfen Endpunkt hin hätte in solchem Falle eine Bürgschaft für die Richtigkeit des Resultats nicht bieten können. Als wir dann in dem von Funk für die Bestimmung des Harnzuckers empfohlenen Bertrandschen Verfahren<sup>1)</sup> eine quantitative Bestimmungsmethode kennen lernten, welche bei größter Einfachheit schnell zu sicheren Ergebnissen führt, entschieden wir uns zu deren Gunsten. Dem von Andersen<sup>2)</sup> erhobenen Einwande, daß die nach Bertrand bestimmten Zuckerwerte infolge der Oxydation des gebildeten Kupferoxyduls zu niedrig ausfallen müßten, läßt sich leicht begegnen. Die empirisch ermittelten Zahlen der Bertrandschen Tabelle zeigen nämlich einfach die Menge Cu an, welche im Momente der Titration noch gefunden wird, wenn unter genauer Innehaltung der Versuchsbedingungen die entsprechende Zuckermenge zum Versuche verwendet wurde. Würde man daher, dem Rate Andersens folgend, durch Ausschluß von Sauerstoff die Oxydation des gebildeten Kupferoxyduls gänzlich zu verhindern suchen, so müßten die aus dem gefundenen Kupfer berechneten Zuckerwerte zu hoch ausfallen. Bei größeren Untersuchungsreihen sind unfreiwillige Abweichungen von einer Vorschrift nicht immer gänzlich zu vermeiden. Eine daraufhin angestellte Untersuchung ergab nun, daß Ausdehnung der Kochdauer auf 4 Minuten, Abkühlung der Lösung vor der Filtration, etwas stärkeres Auswaschen des Cu-Oxyduls, höhere Temperatur des Waschwassers oder Änderungen der Titrationsdauer innerhalb mäßiger Grenzen die Genauigkeit des Resultats merklich nicht beeinflussen. Andererseits sei aber auch erwähnt, daß in 2 Blutproben die Bestimmung mißglückte. In dem ersten Falle schied sich neben dem körnigen, roten Kupferoxydul eine hellgelb gefärbte Substanz, dem Aussehen nach kolloidales Cu-Oxydul ab, welche sich durch Auswaschen leicht entfernen ließ; in dem zweiten Falle trat dieselbe Erscheinung, aber erst in dem Filtrat auf. Seitdem kühlen wir die reduzierte Lösung vor dem Filtrieren eine Minute in Wasser und haben einen Mißerfolg weiterhin nicht mehr beobachtet. Vor Verwendung der Lösungen stelle

<sup>1)</sup> Bull. de la Soc. chim. de Paris, Bd. XXXV, S. 125.

<sup>2)</sup> Bioch. Zeitschrift, Bd. XV, S. 76.

man durch einen blinden Versuch mit Wasser an Stelle der Zuckerlösung das Selbstreduktionsvermögen der Lösungen fest. Dasselbe betrug 3—4 Tropfen gleich 0,15—0,2 ccm Kaliumpermanganatlösung. 10 ccm dieser Lösung waren äquivalent 11,058 mg Cu. Mit dieser Lösung, deren Titer später mehrfach kontrolliert wurde und keine Änderung aufwies, wurden alle Bestimmungen dieser Arbeit ausgeführt. Der auf die Selbstreduktion entfallende Betrag muß bei der Berechnung in Abzug gebracht werden.

Da die späteren Versuche eine genügende Zahl von Belegen für die Verlässlichkeit der Methode bringen, sei hier nur erwähnt, daß bei einem Gehalt des Blutes von nur 12 mg an reduzierender Substanz, bezogen auf Traubenzucker, noch ausreichend genaue quantitative Bestimmungen sich ausführen lassen.

Der Anwendung des Bertrand'schen Verfahrens am Gesamtblut erwachsen nun aber Schwierigkeiten aus dem Magnesiumgehalt der nach der «Eisenmethode» entweißten Lösungen. Das bei alkalischer Reaktion sich abscheidende Magnesiumhydroxyd machte die Filtration der reduzierten Lösung unmöglich. Die Anwendung anderer Sulfate oder Neutralsalze erwies sich als praktisch undurchführbar, da die zur Ausflockung nötige Menge die zur polarimetrischen Untersuchung erforderliche Konzentration nicht mehr gestattete. Mit Zinksulfat, welches als saures Oxalat aus dem Filtrat der Eiseneiweißfällung entfernt wurde, ließen sich brauchbare Lösungen erzielen. Das Verfahren sei erwähnt, weil von den Versuchen zwei in der Tabelle I Aufnahme gefunden haben.

Nach Zusatz der erforderlichen Eisenmenge wird mit einer bekannten, zur Ausflockung genügenden Menge krystallisierten Zinksulfats versetzt. Nach völliger Ausfällung des Hämoglobins füge man zu dem wasserklaren Filtrat etwas mehr von einer  $\frac{1}{10}$ -norm. neutralen Kaliumoxalatlösung hinzu, als zur Bindung des gesamten Zinks genügt, und versetze dann mit dem gleichen Quantum  $\frac{1}{10}$ -norm.-Essigsäure. Es tritt Trübung ein. Ohne zu filtrieren, wird im Vakuum stark eingeengt, die Flüssigkeit von den Krystallen abgegossen und der Destillationsrückstand sorgfältig mit 10%igem Alkohol ausgezogen. Die wässrige

Lösung und die mit ihr vereinigten, alkoholischen Auszüge werden nun weiter im Vakuum eingeengt.

Trotzdem, wie die Versuche der Tabelle I zeigen, diese Methode zu brauchbaren Ergebnissen führt, mußte das Verfahren aufgegeben werden, weil, ohne daß die Ursache dafür sich aufklären ließ, mit dem Zink gleichzeitig ein erheblicher Teil des Zuckers in einigen Fällen niedergeschlagen und damit dem Nachweise entzogen wurde. Als Beispiel sei der folgende Versuch angeführt.

#### Versuch V.

Für Hundeblood, welches mit der «Eisenmethode» und Magnesiumsulfat enteiweißt worden war, hatte sich als mittlerer Wert von 13, zu verschiedenen Zeiten angestellten Bestimmungen polarimetrisch ein Zuckergehalt von 0,097% ergeben. Die Zinkausfällungsmethode ergab als Mittel von zwei weiteren Bestimmungen einen polarimetrisch bestimmten Wert von 0,062%. Es wurde, da ein Verlust an Zucker wahrscheinlich war, der Rückstand beider Kolben in verdünnter Salzsäure aufgenommen und an der alkalisch gemachten Lösung die Trommersche Probe mit deutlich positivem Erfolge angestellt.

Aus diesem Grunde haben wir die einige Zeit später von Rona<sup>1)</sup> und Michaelis angegebene Ausfällung des Zinks als Carbonat nicht nachgeprüft, zumal auch dies Verfahren zu einer vorübergehend alkalischen Reaktion führt, die nach den Untersuchungen von Lobry de Bruyn und v. Ekenstein<sup>2)</sup> unter allen Umständen vermieden werden muß.

Zu besseren Ergebnissen hingegen gelangt man, wenn die Ausflockung mit Mononatriumphosphat vorgenommen wird, von dem soviel einer ca. 1/10-norm.-Lösung hinzugefügt wird, bis vollständige Ausflockung erfolgt. Die Lösung läßt sich zur Polarisation genügend einengen und gestattet ohne weiteres die nachfolgende Bestimmung nach Bertrand. Ein weiterer Vorzug ist der deutlich gärungsfördernde Einfluß, welchen die Anwesenheit der Phosphate ausübt.

Trotz der großen Vorteile, welche die Enteiweißung mit

<sup>1)</sup> Bioch. Zeitschrift, Bd. XVI. S. 60.

<sup>2)</sup> Rec. d. travaux chim. des Pays-Bas. Bd. XV. S. 92.

kolloidalem Eisenhydroxyd, namentlich in dieser Form, vor anderen Enteiweißungsverfahren bietet, stellen sich auch jetzt noch Schwierigkeiten ein, welche jedoch weniger durch die Methode als solche wie durch die wechselnde Zusammensetzung der Eisenpräparate des Handels verursacht sind und namentlich dann sich geltend machen, wenn an Hämoglobin reiche Lösungen, wie Erythrocytenaufschwemmung, zu untersuchen sind. Daß dann die Enteiweißung sich nicht so «schematisch» einfach gestaltet, wie bei der Untersuchung von Serum, haben bereits Rona und Michaelis<sup>1)</sup> betont, welche auch schon in ihrer ersten Abhandlung<sup>2)</sup> darauf aufmerksam gemacht haben, daß das Ferrum oxychloratum zur Enteiweißung sich nicht eigne.

Als dann Großer<sup>3)</sup> feststellte, daß aus Lamellen bereitete, kolloidale Eisenhydroxydlösungen ebenfalls für den Zweck unbrauchbar seien und eine Untersuchung derselben uns zeigte, daß dieselben beträchtliche Mengen von Chlor enthielten, lag es nahe, die beobachteten Störungen auf den Chlorgehalt zurückzuführen, den auch Lösungen des Ferrum oxydatum solubile verum aufweisen. Es stellte sich dabei heraus, daß Lösungen, die über 0,6% Cl enthielten, bei der Ausfällung stets versagten, während in Lösungen, welche sich als brauchbar erwiesen, der Chlorgehalt 0,44% nicht überschritt. Auch bei Verwendung dieser Lösungen glückten indessen auch unter scheinbar ganz gleichen Bedingungen nicht alle Glieder eines Versuches. Chlorfreie Lösungen werden technisch überhaupt nicht dargestellt, weil eine völlige Entfernung des Chlors durch Dialyse das Sol sofort in den Gelzustand überführt.<sup>4)</sup> Da nun aber die Eisenlösung in starker Verdünnung zur Anwendung gelangt, ist anzunehmen, daß in der Lösung etwa noch vorhandenes Ferrum oxychloratum weitgehend hydrolytisch dissoziiert ist.

1) Bioch. Zeitschrift, Bd. XVI, S. 60.

2) Bioch. Zeitschrift, Bd. VII, S. 329.

3) M. Mediz. W., 1908.

4) Herr Rona konnte laut freundlicher, brieflicher Mitteilung unter diesen Verhältnissen die beschriebene Umwandlung nicht bestätigen. Diese Tatsache spricht unseres Erachtens ebenfalls dafür, daß die Handelspräparate nicht einheitlicher Natur sind.

Die weitere Dialyse einer wirksamen, 0,43% Cl enthaltenden Lösung zeigte denn auch, daß das Dialysat nach kurzer Zeit bereits blaues Lackmuspapier rötet und langsam Kongopapier violett bis blau färbt. Den gleichen Erfolg erreicht man, wenn die dunkelbraune Eisenlösung bis zu hellbraungelber Färbung verdünnt wird.

Durch diese Feststellung ist bewiesen, daß das Ferrum oxydatum dialysatum solubile verum kein reines, dem Eiweiß gegenüber chemisch indifferentes Kolloid darstellt, welches nur vermöge seiner Oberflächenkräfte wirkt, sondern daß es außerdem als eine, wenn auch stark verdünnte Salzsäurelösung chemisch zu bewerten ist.

Mit dieser Erkenntnis entfiel daher auch ein Hauptgrund, an der «Eisenmethode» festzuhalten, um so mehr, als die Erfahrungen, welche bei den zahlreichen Ausflockungsversuchen gesammelt worden waren, andere Wege wiesen.

Bei diesen Versuchen hatte sich nämlich gezeigt, daß Lösungen, welche nach Zusatz der verschiedensten Elektrolyte nicht ausflockten oder einen Teil ihres Hämoglobins hartnäckig festhielten, sofort klare, farblose Lösungen gaben, wenn sie mit bestimmten, an sich zur Ausflockung ungenügenden Mengen Alkohol und dann mit alkoholischer Phosphorwolframsäure versetzt wurden. Indessen trübten sich solche klare Lösungen wieder, wenn sie eingeengt wurden, und hinterließen dann einen wägbaren Rückstand von Fett. Wurde soviel Alkohol dann zugesetzt, bis klare Lösung erfolgte, so ließen sie sich wie wässrige Lösungen polarimetrisch untersuchen. Der Fettgehalt ist so beträchtlich, daß eine Verwendung des Verfahrens zur quantitativen Bestimmung fettartiger Substanzen in kleinen Mengen tierischer Flüssigkeiten aussichtsvoll erscheint. Untersuchungen darüber sind im Gange. Diese Erfahrungen forderten dazu auf, die Enteiweißung mit wässriger Phosphorwolframsäure zu versuchen.

Die Phosphorwolframsäure ist zum Zwecke der Zuckerisolierung aus eiweißhaltigen Lösungen zuerst von Scheibler<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> Tollens bei Abderhalden, Handbuch der bioch. Arbeitsmethoden. II, 1, 52.

angewendet worden. Für die Enteiweißung von Blut zum Zwecke der quantitativen Zuckerbestimmung hat Reid<sup>1)</sup> sie benutzt. Jedoch gestattet sein Verfahren nur die Anwendung der Reduktionsmethoden. Es mußte daher zunächst festgestellt werden, inwieweit die Enteiweißung mit Phosphorwolframsäure die Anwendung auch der anderen Methoden möglich machen würde. Die violette Verfärbung, welche Phosphorwolframsäurelösungen annehmen, wenn sie mit organischen Stoffen in Berührung treten, ließ ihre Brauchbarkeit von vornherein zweifelhaft erscheinen, da diese Verfärbung auf Reduktion der Phosphorwolframsäure hinweist und zugleich die polarimetrische Bestimmung stark zu beeinträchtigen droht. Vorversuche ergaben aber, daß von Phosphorwolframsäurelösungen mit Traubenzuckerzusatz sich nur diejenigen Proben verfärbten, welche der Einwirkung des direkten Sonnenlichtes ausgesetzt wurden, während im Dunkeln aufbewahrte Kontrollösungen in der gleichen Zeit farblos blieben. Die nachherige Bestimmung des Zuckergehalts zeigte in den verfärbten 3—5%igen Phosphorwolframsäurelösungen nach 3 tägiger Lichteinwirkung einen Zuckerverlust bis zu 5 mg; in den farblosen Lösungen hatte sich in der gleichen Zeit der Zuckergehalt nicht geändert.

Die Verluste, welche Friedr. Müller<sup>2)</sup> bei Gewinnung des Glukosamins unter Verwendung der Phosphorwolframsäure zu verzeichnen hatte, sind daher wohl eher durch die Anwesenheit der Aminogruppe in dieser Substanz und weniger durch ihre Zuckernatur zu erklären.

Die Berücksichtigung dieser Erfahrungen führte zur Ausarbeitung des folgenden Enteiweißungsverfahrens.

### Enteiweißung mit Phosphorwolframsäure.

Das in Ammoniumoxalat aufgefangene Blut wird mit der 10—20fachen Menge destillierten Wassers verdünnt und unter beständigem, kräftigen Schütteln tropfenweise mit einer frisch

<sup>1)</sup> Journ. of Physiol., Bd. XX, S. 316.

<sup>2)</sup> Sitzungsber. d. Ges. d. Naturw. zu Marburg. 1896 u. 1898. Zeitschrift f. Biologie, Bd. XLII.

bereiteten, 10%igen Lösung von Phosphorwolframsäure (Kahlbaum) versetzt, bis deren Menge der angewandten Blutmenge nahezu entspricht. Nun wird kräftig 2 Minuten lang geschüttelt und, falls sich dann noch größere Schaumbblasen an der Oberfläche zeigen, mit dem Zusatz der Säure so lange fortgefahren, bis nach kräftigem Schütteln nur ein unterbrochener Kranz von makroskopisch noch erkennbaren Blasen an der Grenze zwischen Glas und Flüssigkeitsoberfläche sich zeigt.

Nach einigen Minuten gibt sich die vollendete Enteiweißung an der Trennung in einen schokoladebraunen, langsam absetzenden Niederschlag und eine wasserklare Flüssigkeit zu erkennen. Unter Lichtabschluß wird filtriert. Die ersten, trüben Anteile werden zurückgegossen. Sobald die Flüssigkeit vollständig klar abläuft, wird das Filtrat mit 20 ccm (bei Verwendung von 25—150 ccm Blut) einer 10%igen neutralen Bleiacetatlösung versetzt. Nach beendeter Filtration wird der Niederschlag vom Filter entfernt, dieses ausgepreßt und der durch ein Filter gegebene Rest nach völliger Klärung mit dem Hauptfiltrat vereinigt. Vom phosphorwolframsauren Blei wird sehr sorgfältig abfiltriert, mit Schwefelwasserstoff unter Druck entbleit, dann filtriert. Nachdem das Volumen des Filtrates (Aliquoter Teil = Z) festgestellt ist, wird im Vakuum bei einer Temperatur des Wasserbades von 38—41° bis auf wenige Kubikzentimeter eingeengt. Die Lösung wird quantitativ in ein Meßkölbchen übergeführt (aliquoter Teil = c). Zur polarimetrischen Untersuchung wird durch ein gehärtetes Filterchen filtriert, um die Spuren ausgeschiedenen Schwefels zu beseitigen. Die völlige Enteiweißung gibt sich durch die Abnahme der Viskosität deutlich zu erkennen; fast momentan wird die bis dahin stark schäumende Flüssigkeit leicht beweglich, und gleichzeitig verschwindet die Schaumbildung. Bei Verwendung von 50 ccm Blut genügen meistens 54—58 ccm Phosphorwolframsäurelösung; ein mäßiger Überschuß, im ganzen 70—80 ccm, hat sich als unschädlich erwiesen. Der frühzeitige Zusatz des Bleiacetats kürzt durch Ausfällung der überschüssigen Phosphorwolframsäure deren Einwirkungsdauer auf den Zucker tunlichst ab. Die eiweiß- und biuretfreien Lösungen lassen sich

bis auf etwa  $\frac{1}{20}$  des ursprünglichen Blutvolumens einengen, ohne daß Krystallisation erfolgt. Denn außer dem Eiweiß werden sowohl eine Reihe von krystallisierenden Verbindungen des Serums als auch die sämtlichen Zusätze mit Ausnahme des geringen Restes an Essigsäure entfernt, welcher durch einfache Destillation im Vakuum sich nicht beseitigen läßt. Die Lösungen sind dann klar und zeigen in 2 dm dicker Schicht, auf ca.  $\frac{1}{5}$  des Blutvolumens eingeengt, eine schwache Gelbfärbung, welche die Untersuchung bei Beleuchtung durch die Natriumflamme in keiner Weise beeinträchtigt. In praxi findet indessen die weitere Einengung ihre Grenze an der mit der Konzentration der Lösung zunehmenden Gelbfärbung. In dieser Hinsicht unterscheiden sich die Lösungen in nichts von den mit der «Eisenmethode» erhaltenen, haben vor letzteren aber den Vorzug, daß auch die letzten Spuren eiweißartiger Substanzen entfernt sind. Meistens wurden 50—100 ccm Blut auf einmal verarbeitet. Es werden je nach der angewandten Verdünnung 75—95% auch von hämoglobinreicher Gesamtfüssigkeit, wie Blutkörperchenaufschwemmung, wiedergewonnen; eine quantitative Bestimmung des Zuckers in den Blutzellen, die bisher Schwierigkeiten bereitet, dürfte sich daher leicht bewerkstelligen lassen. Die Möglichkeit, das Verfahren mit anderen Enteiweißungsmethoden zu verbinden, wird für präparative Arbeiten manchen Vorteil bieten.

Die Bestimmung des Zuckers mit Hilfe der Reduktionsmethode schließt sich an die polarimetrische Bestimmung ohne weiteres an. Um die Menge der durch Hefe vergärbaren Substanz festzustellen, wird nach der Polarisation mit bekannten Mengen wässriger Hefeaufschwemmung verdünnt. Unter Umständen kann es erwünscht sein, vom Aliquoten Teile (Z) einen bekannten Anteil nach sorgfältiger Entfernung des Schwefels direkt zu vergären. Nach beendigter Gärung wird die Hefe in genau der gleichen Weise wie das Eiweiß mit Phosphorwolframsäure entfernt oder aber ebenso sicher und einfacher mit bekannten Mengen — einigen Tropfen — einer verdünnten, hellbraunen, kolloidalen Eisenhydroxydlösung ausgefällt. Elektrolytzusatz ist unnötig. Das Volumen des Filtrats wird sorg-

fältig gemessen und im Vakuum eingeengt. Die konzentrierte Lösung wird dann genau auf das Volumen ( $c''$ ) gebracht, welches seinem nun noch vorhandenen Gehalte an  $c$  entspricht. Es wird wiederum polarisiert und die polarimetrisch untersuchte Lösung nach dem Bertrand'schen Verfahren auf ihr Reduktionsvermögen usw. geprüft.

Die Berechnung des Zuckergehalts aus dem Drehungsvermögen geschieht nach der früher<sup>1)</sup> aufgestellten Formel, auf welche sich die Buchstabenbezeichnungen beziehen:

$$x = \frac{c \cdot z \cdot l}{Z \cdot 100}$$

Die Berechnung der Reduktionswerte ergibt sich

daraus von selbst. Bezüglich der polarimetrischen Ablesungen und deren Angabe bis in die dritte Dezimale sei bemerkt, daß die Untersuchung an zwei empfindlichen Apparaten von Schmidt und Haensch mit dreiteiligem Gesichtsfeld vorgenommen wurde. Der Ablesungsfehler betrug in den Versuchen  $\pm 0,00 - 0,01^\circ$  bzw.  $\pm 0,01 - 0,02^\circ$  bei Natriumlicht. Durch die Art der Ablesung konnte der Fehler so gut wie vollständig ausgeschaltet werden. Es wurde nämlich abwechselnd von einer Ausgangsstellung des Gesichtsfeldes hell — dunkel — hell und dunkel — hell — dunkel auf gleichmäßige, minimale Helligkeit eingestellt, ohne dabei in die entgegengesetzte Gesichtsfeldeinstellung überzugehen. Das Mittel aus 10—14 Einzelbeobachtungen wurde notiert. Als Beobachtungsröhre diente ein Rohr von 189,4 mm Länge und 5,8 ccm Inhalt. Siehe Beispiel Versuch 6, S. 410.

Zu den folgenden Versuchen dienten gesunde, weibliche Hunde im Gewicht von 19,9, 10 und 9 kg, denen ihre aus Fleisch und Hundekuchen zusammengesetzte Nahrung stets zur gleichen Tageszeit, und zwar zuletzt 24 Stunden vor der Blutentnahme, gereicht wurde. Das Blut wurde Hunden und Pferd aus der Vena jugularis, den mit Hafer gefütterten Kaninchen aus der Randvene des Ohres entzogen. Das Rinderblut entstammt gesunden Schlachttieren, dem Polycytämiekranken wurde das Blut aus der Vena cubitalis entnommen.

<sup>1)</sup> Bioch. Zeitschrift. Bd. XIII, S. 124 (mit P. Rona).

Zunächst sei über diejenigen Versuche berichtet, in denen der Rotations- und Reduktionswert verglichen wurde, siehe Tabelle I. Aus den Versuchen 1 und 2 geht hervor, daß die so ermittelten Zuckerwerte innerhalb der durch die Methode bedingten Fehlergrenzen als identisch betrachtet werden dürfen. Von Interesse ist dabei, daß zwischen den am gleichen Tiere vorgenommenen Versuchen 2a und b ein Zeitraum von etwa 6 Wochen liegt. Diese Übereinstimmung bleibt indessen bei den folgenden Versuchen nicht bestehen. Könnte im Versuch 3 allenfalls ein Fehler bei der Bestimmung untergelaufen sein, so zeigt doch schon die nächste sowie die Doppelbestimmungen, daß diese Differenz zugunsten der durch Reduktion ermittelten Werte tatsächlich besteht. Die Enteiweißung mit Hilfe des kolloidalen Eisenhydroxyds und Ausfällung mit Zinksulfat oder Mononatriumphosphat, Versuch 9—12, läßt keine prinzipiellen Verschiedenheiten gegenüber der Phosphorwolframsäureenteiweißung erkennen; im Versuch 12 wird jedoch die Differenz zwischen Rotations- und Reduktionsvermögen so erheblich, daß die rechtsdrehende Substanz nur noch einen verhältnismäßig geringen Betrag der reduzierenden Substanz darstellt. Im Versuch 9 ergibt für den Reduktionswert die Enteiweißung mit Phosphorwolframsäure den gleichen Wert wie die Enteiweißung nach dem Verfahren von Schenck. Die Tatsache, daß die Reduktionswerte meistens höher liegen als die polarimetrisch bestimmten Zuckerwerte, ist schon lange bekannt und beruht vor allem auf der Anwesenheit linksdrehender Substanzen. Da deren Menge aber im Vergleich zum Traubenzucker als unwesentlich gilt und außerdem die Herstellung von Lösungen, welche die gleichzeitige Anwendung beider Bestimmungsmethoden an der gleichen Probe hämolytierten Gesamtbluts gestatten, bisher in einwandfreier Weise nicht gelang, so wurde die Zuckerbestimmung durch Reduktionsmethoden im allgemeinen bevorzugt. Die beschriebenen Versuche zeigen nun zunächst in ganz eindeutiger Weise, daß das eingeschlagene Verfahren mit Ausnahme der Versuche 1 und 2 a b ebensowenig wie alle anderen bekannten Verfahren der Enteiweißung imstande ist, den Traubenzucker

Tabelle I. Oppler.

Nr.	Blutart	Blut	l	Z	Polarisation			Bertrand				Enteiufigungs- verfahren		
					c	z	im Blut Zucker mg %	c'	Cu mg in c'	Zucker mg in c'	im Blut Zucker mg %			
1	Hund	57,2	1185,2	938	10,58	0,42	56,15	0,098	9,62	74,9	39	54,20	0,095	Phosphor- wolframsäure — Pb-Acetat
2 a	"	45,3	905,3	765	8,88	0,345	36,25	0,080	8,25	55,84	28	35,67	0,079	
b	derselbe	25,8	1061,8	972	8,39	0,145	13,29	0,052	7,85	24,33	12	14,01	0,054	
3	Hund	53	1197,5	920	9,21	0,33	39,57	0,075	8,03	59,71	30	44,78	0,085	
4 a	"	51	1116	857	9,25	0,58	69,86	0,137	9,15	105,1	56	73,72	0,145	
b	"	51	1116	898	9,92	0,55	67,80	0,133	9,29	110,13	59	78,29	0,154	
5 a	Polycyämie	50	1138	968	9,53	0,535	59,94	0,120	8,95	99,47	53	66,35	0,133	
b	"	50	1108	942	9,25	0,545	59,30	0,119	8,65	106,7	57	71,69	0,143	
6 a	Rind	50	720	540	9,45	0,255	32,13	0,064	8,85	54,2	28	39,86	0,080	
b	"	50	720	545	8,6	0,275	31,24	0,063	8,0	54,7	28	39,77	0,080	
7	"	100	2230	1885	12,05	0,39	55,60	0,056	5,5	61,94	32	82,94	0,083	
									5,85	64,69	33	80,41	0,080	

Tabelle I.

Fortsetzung.

Nr.	Blutarl	Blut	I	Z	Polarisation		Bertrand				Enteweißungs- verfahren			
					c	z	im Blut Zucker	mg	%	c'		Ca mg	Zucker mg	im Blut Zucker
8 a	Rind	50	1118	938	10,27	0,21	25,71	0,051	9,4	51,42	26	33,86	0,068	Phosphor- wolfransäure - Pb-Acetal
b	"	50	1120	932	9,4	0,24	27,11	0,054	8,7	53,6	27	35,06	0,070	
9 a	"	50	1110	937	9,17	0,20	21,73	0,044	8,75	57,5	29	35,92	0,072	Schenck, cf. Ann. S. 421
b	"	100	2220	1871	12,05	0,34	48,61	0,049	—	—	—	—	—	
c	"	50	—	—	20,6	—	—	—	16,35	45,89	23	38,00	0,076	Oxalat
d	"	50	—	—	20,6	—	—	—	19,65	50,87	26	35,48	0,071	
10 a	Hund	24,3	—	20,86	9,07	0,155	14,06	0,067	7,85	34,12	17	22,88	0,094	Fe OH <sub>3</sub> — Zn-
b	"	23,5	Z = Blut	20,93	9,6	0,13	12,48	0,060	8,49	33,12	16	20,32	0,086	
c	"	31,7	—	26,58	8,95	0,20	17,90	0,067	—	—	—	—	—	Fe OH <sub>3</sub> — Zn- Oxalat
d	"	23,6	—	20,97	8,59	0,15	12,88	0,061	—	—	—	—	—	
11	Kaninchen	34	1150	880	9,0	0,23	27,05	0,080	8,2	43,2	22	31,56	0,093	Fe OH <sub>3</sub> — NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
12	"	25	1095	1031	9,7	0,12	12,36	0,050	8,5	53,9	27	32,73	0,131	

frei von störenden Beimengungen zur Bestimmung zu bringen und ferner, daß die als unwesentlich geltende Differenz zwischen den aus Rotation und Reduktion berechneten Traubenzuckerwerten gar nicht so selten erheblichere Werte annehmen kann. Es ergibt sich daraus die Notwendigkeit, mehr als bisher, namentlich bei klinischen Untersuchungen, diesen Verhältnissen die volle Aufmerksamkeit zuzuwenden und die Bestimmung des Traubenzuckers stets nach 2 Methoden vorzunehmen. Es bleibt dabei die Wahl zwischen Polarisation und Reduktion einerseits und der Polarisation vor und nach der Gärung zunächst offen. Der folgende Versuch zeigt nun aber gleich, daß diese Freiheit der Wahl doch nur eine beschränkte ist. In Versuch 13 am Pferdeblut, enteiweißt mit Eisenhydroxyd und Mononatriumphosphat, ergibt die polarimetrische Bestimmung einen negativen Wert, so daß die Bestimmung durch Reduktion im Zweifel darüber lassen würde, ob hier überhaupt rechtsdrehende Substanz vorhanden ist. Es kam demnach zum Nachweise etwa vorhandener rechtsdrehender Substanz in diesem Fall nur die Bestimmung mit Hilfe der Gärung in Frage.

Die polarimetrische Bestimmung ergab in

$$c = 9,68 \text{ ccm vor der Gärung } \alpha = - 0,25^{\circ}$$

$$c'' = 6,49 \text{ » nach » } - 0,62^{\circ}$$

Die Bertrandsche Bestimmung ergab in der vorgorenen Lösung das völlige Fehlen reduzierender Substanz. Es ergibt demnach dieser Versuch, daß neben rechtsdrehender, vergärbarer Substanz, deren Konzentration auf Traubenzucker bezogen 0,102% beträgt, erhebliche Mengen linksdrehender, weder vergärbarer, noch reduzierender Substanz vorhanden sind, welche demnach nicht zum «Restzucker» gerechnet werden kann. Ob hingegen die rechtsdrehende Substanz nur Traubenzucker war, und ob außerdem noch weitere, optisch aktive, vergärbare Substanzen gleichzeitig durch die Hefe zerstört wurden, läßt sich nicht entscheiden, da für weitere Versuche nicht genügend Material mehr zur Verfügung stand.

Darüber gibt indessen der folgende Versuch in völlig eindeutiger Weise Aufschluß.

## Versuch 6 (Tabelle I).

6 a	6 b	6 c
Ammoniumoxalat- blut vom Rind 50 ccm	50	Traubenzuckerlösung 0,345 ‰ 11 = 38,5 mg Zucker
H <sub>2</sub> O . . . . . 600	600	50
10 ‰ Phosphor- wolframsäure 70	70	600
1 = 720	720	731
Z abzüglich 20 ccm 10 ‰ Bleiacetatlösung = 540 ccm c = 9,45 ccm z = 0,255 ‰	545 8,60 0,275 ‰	558 9,39 0,565
50 ccm Blut enthalten 32,13 mg Zucker x = 0,064 ‰	31,24 mg Zucker 0,063 ‰	69,51 — 38,50 31,01 0,062 ‰
Bestimmung nach Bertrand c' = 8,85 ccm von c c' = 54,2 mg Cu = 28 mg Zucker	8,0 54,7 mg Cu = 28 mg Zucker	von c werden 8,75 ccm mit Hefeaufschwemmung verdünnt auf 17,95 15 St. 28 ‰  + Eisenlösung auf 18,81
50 ccm Blut enthalten 39,86 mg Zucker x' = 0,080 ‰	39,77 mg Zucker 0,080 ‰	Filtrat = 16,2 ccm c'' = 7,5 ‰ z'' = — 0,08 ‰
		Bertrand: 7,2 ccm von c'' = 3 Tropfen Kaliumpermanganatlösung 3 Tropfen = 0,15 ccm = Selbst- reduktion der Bertrandschen Lösung. Wahrer polarimetrischer Zucker- wert: c = 9,39 z = 0,565 + 0,08 = 0,645 ‰, woraus sich nach Abzug von 38,5 mg ergibt x = 0,079 ‰.

Durch die gleichzeitige Anwendung der Gärung neben der Reduktionsbestimmung der unvergorenen und der vergorenen Lösung gelang es festzustellen, daß der durch Reduktion ermittelte Wert für Traubenzucker identisch mit dem aus dem Gärungsversuch berechneten Werte ist. Ferner wurde wiederum festgestellt, daß die durch Gärung nicht zerstörte, linksdrehende Substanz alkalische Cu-Lösung nicht reduziert und schließlich, da bei der Gärung gleichzeitig Traubenzucker der Lösung zugesetzt worden war, daß die Enteiweißung mit Phosphorwolframsäure auch die gleichzeitige Anwendung der Gärung anstandslos ermöglicht. Demnach ergibt dieser Versuch ebenso wie die Versuche 1 und 2a—b, daß in einer Reihe von Fällen bei Anwendung des beschriebenen Verfahrens die quantitative Traubenzuckerbestimmung des Gesamtbluts nicht nur relativ, sondern absolut quantitativ ist.

Schwieriger ist die Deutung der folgenden Versuche Tabelle II 18a, 7a—b, 9b—a (siehe auch Tab. I). Die Entweißung geschah mit Phosphorwolframsäure. Es decken sich hier die durch Polarisation, Gärung und Reduktionsmethode ermittelten Werte nicht mehr; linksdrehende Substanz ist vorhanden; während diese in den Versuchen 6c und 14a—b aber kein Reduktionsvermögen mehr aufweist, zeigt sie nach Unterbrechung der Gärung in den genannten Versuchen noch ein geringes, aber sicher nachweisbares Reduktionsvermögen. Für eine quantitative Bestimmung nach Bertrand war indessen der Betrag zu gering. Diese Fälle gehören demnach zu jenen, welche das Vorkommen von linksdrehendem Zucker scheinbar beweisen, indessen in diesem Falle nur scheinbar, da die Gegenwart von Resten unvergorenen Traubenzuckers zu demselben Ergebnis hätte führen müssen. Das würde nun aber voraussetzen, daß die Lösung gärungshemmend in diesen Fällen gewirkt hätte. Ist zwar nach den bisherigen Erfahrungen mit Phosphorwolframsäure ein Grund für diese Annahme auch nicht vorhanden, so ergibt sich daraus doch, daß auch dies Verfahren zunächst die Grenze seiner Leistungsfähigkeit dann erreicht hat, wenn gärfähige, linksdrehende Substanz neben Traubenzucker vorhanden ist. Eine Entscheidung darüber, ob diese

Tabelle II. — Oppler.

Nr.	Blut resp. Serum	Rechtsdrehende Substanz bezogen auf Traubenzucker polarimetrisch ‰	Reduzierende Substanz bezogen auf Traubenzucker Bertrand ‰	Vergärbare Substanz bezogen auf Traubenzucker ‰	Linksdrehende Substanz bezogen auf Traubenzucker aus Gärung resp. Bertrand ‰	davon unvergärbbar ‰	Reduktionsvermögen der unvergärbaren linksdrehenden Substanz	Bemerkungen	
6c	Rinderblut	0,062	—	0,079	0,017	0,017	reduziert nicht	Tabelle I u. Seite 410	
b	„	0,063	0,080	—	—	—	reduziert		
a	„	0,064	0,080	—	—	—	reduziert		
18a	„	0,127	0,169	0,142	0,042	0,027	reduziert		Tabelle III
7a—b	„	0,056	0,082	0,061	0,026	0,005	reduziert		I
9b	„	0,049	—	0,057	—	0,008	reduziert		I
a	„	0,044	0,072	—	0,028	—	reduziert		I
14a	„	0,039	—	0,060	0,021	0,021	reduziert nicht		Phosphorwolframsäure — Pb-Acetat
b	dessen Serum	0,045	—	0,064	0,019	0,019	reduziert		
16	Rinderserum	0,062	—	0,062	0,000	0,000	reduziert		Eisenmethode
17a	„	0,103	—	0,103	0,000	0,000	reduziert	Eisenmethode, flocht erst auf Zusatz von $K_2SO_4$ , Tabelle III	
b	„	0,104	0,107	—	0,003	—	reduziert		

oder unvergorener Traubenzucker vorliegt, würde jedoch durch Ausführung der für ähnliche Fälle auch sonst geübten Kontrolle, Vergärung einer weiteren Substanzprobe mit Traubenzuckerzusatz, sich sicher herbeiführen lassen. In den Fällen, wo genügend Untersuchungsmaterial zur Verfügung steht, wie bei Versuchen an Menschen und größeren Tieren, wird das möglich sein. Es sollte demnach eine quantitative Zuckerbestimmung, deren Ausführung bei Enteiweißung mit Phosphorwolframsäure nunmehr in bequemer Weise gelingt, stets aus den von Hoppe-Seyler<sup>1)</sup> bereits geforderten gleichzeitigen Bestimmungen durch Polarisation und Reduktion bestehen. Es wären daher folgende Einzeluntersuchungen erforderlich:

1. Polarimetrische Bestimmung mit nachfolgender Reduktionsbestimmung;
2. Kontrollbestimmung;
3. Polarimetrische Bestimmung vor und nach der Gärung, Bestimmung des Reduktionsvermögens nach beendigter Gärung, resp. Probe auf Kohlenhydrate, Glukuronsäure usw.
4. Kontrollbestimmung mit Zusatz bekannter Traubenzuckermenge.

Ist jedoch wie in den Versuchen 1 und 2 die vollständige Durchführung unnötig, oder erweist sie sich als unmöglich, so dürfte doch in der Regel die Bestimmung durch Polarisation und Reduktion der Bestimmung durch Polarisation vor und nach der Gärung vorzuziehen sein. Die zahlreichen Manipulationen bei Anwendung der letzteren Methode vergrößern allein schon die Gefahr der Fehler. Der Endpunkt der Vergärung ist schwer zu bestimmen: da ferner durch Hefe, welche kein chemisch reines Reagens, sondern ein lebender Organismus ist, weiterhin optisch aktive Stoffe in die Lösung hineingeraten oder im Verlaufe der Gärung entstehen können, ist eine Quelle für neue Täuschungen gegeben.

Nach alledem läuft also, wie auch Hollinger<sup>2)</sup> betont, sobald die quantitative Bestimmung des isolierten Traubenzuckers nicht gelingt, die Aufgabe darauf hinaus, die Art und

<sup>1)</sup> Handbuch der phys. u. pathol. chem. Analyse, 8. Aufl., 1909, S. 657.

<sup>2)</sup> Bioch. Zeitschrift, Bd. XVII, S. 7.

Menge dieser linksdrehenden Substanz zu bestimmen. Nach beiden Richtungen hin ergibt das angewandte Verfahren Anhaltspunkte.

Zunächst ist bemerkenswert, daß, wie aus Versuch 14 (Tab. II) ersichtlich ist, die linksdrehende Substanz ganz oder zum größten Teile dem Serum angehört. Das ist wichtig für die präparative Darstellung der Substanz. Das Serum wurde 7 Stunden später verarbeitet als das Blut, welches noch lebenswarm enteiweißt wurde. Der Versuch bestätigt demnach zugleich die von Rona und Michaelis bereits einwandfrei festgestellte Tatsache, daß innerhalb dieser Frist eine Änderung des Zuckergehalts infolge von Glykolyse nicht eintritt.

Aus den Versuchen 3—10 (Tab. I) ist weiterhin ersichtlich, daß trotz verschiedener Vorbehandlung des Blutes in den Versuchen 3—9 einerseits und 10 andererseits die Differenz zwischen polarimetrischer und Reduktionsbestimmung beobachtet wird. In den jeweils zusammengehörigen Analysenpaaren zeigen aber sowohl die polarimetrischen Bestimmungen wie die Bestimmungen nach Bertrand unter sich eine weitgehende Übereinstimmung. Die Abweichungen überschreiten nicht den Fehlerbereich der Methodik. Um so auffallender ist der Ausfall des Versuches 15, Tabelle III. Als nämlich verglichen wurde, ob bei Anwendung der «Eisenmethode» die gleichen Werte sich ergeben wie bei der Ausflockung des Eisenhydroxyds mit Mononatriumphosphat, zeigte es sich, daß nun die polarimetrischen Bestimmungen nicht mehr übereinstimmten. Die Bertrandsche Bestimmung ergab für 15 b eine Zahl, welche dem polarimetrisch bestimmten Werte von 15 a nahezu gleich war, während die beiden polarimetrischen Bestimmungen eine bedeutende Abweichung untereinander aufwiesen, die durch Beobachtungsfehler nicht erklärt werden konnte. Dagegen stimmte das Ergebnis in dem Versuch 15 b wiederum gut zu den in Tabelle I, Nr. 3—12, niedergelegten Befunden, welchen allen gemeinsam ist, daß die Enteiweißung bei saurer Reaktion stattgefunden hatte. Die Prüfung der Reaktion der mit Magnesiumsulfat ausgeflockten Lösung 15 a ergab nun für Lackmus unbestimmte Reaktion, während in 15 b die Reaktion, die nicht

Tabelle III. — Oppler.

Nr.	Tierart	Blut, Serum	I	Z	Polarisation			Bertrand				Enteweißungs- verfahren		
					c	z	im Blut Zucker	e'	Cu mg in e'	Zucker mg in e'	im Blut Zucker			
											mg		%	mg
15 a	Hundeblut	30,5	1198,5	970	11,15	0,20	27,56	0,090	—	—	—	—	—	$\text{Fe}(\text{OH})_3$ — $\text{MgSO}_4$
b	"	35,0	1284	967,5	10,25	0,07	9,5	0,027	8,45	36,16	18	28,98	0,083	$\text{Fe}(\text{OH})_3$ — $\text{NaH}_2\text{PO}_4$
17 a	Rinder- serum	50	870	759	10,55	0,425	51,4	0,103	—	—	—	—	—	$\text{Fe}(\text{OH})_3$ — $\text{K}_2\text{SO}_4$
b	"	50	850	760	9,0	0,515	51,84	0,104	7,55	77,81	40	53,33	0,107	$\text{Fe}(\text{OH})_3$ — $\text{K}_2\text{SO}_4$
c	"	50	857	743	9,07	0,435	45,51	0,091	8,15	86,25	45	57,76	0,116	Phosphorwolfram- säure — Pb-Acetat
18 a	"	100	2200	2000	11,3	1,02	126,8	0,127	4,05	103,4	55	168,8	0,169	$\text{Fe}(\text{OH})_3$
b	"	100	2250	2029	11,68	0,53	68,65	0,069	6,3	147,1	81	166,5	0,167	Phosphorwolfram- säure — Pb-Acetat

mehr geprüft werden konnte, natürlich sauer gewesen sein muß. Damit schien, was Rona und Michaelis<sup>1)</sup> allerdings ohne Begründung als Vermutung geäußert hatten, sicher bewiesen, daß die bei dem angewandten Verfahren im Blute nachweisbare, linksdrehende Substanz eine Säure sei, die durch die Enteiweißung bei saurer Reaktion aus ihren Verbindungen frei gemacht wird. Für den vorliegenden Zweck der quantitativen Traubenzuckerbestimmung im Blute würde das aber bedeuten: «Die Eisenmethode» gibt im Gegensatz zu ihren Modifikationen und im Gegensatz zur Phosphorwolframsäure-enteiweißung bei polarimetrischer Bestimmung den absoluten Traubenzuckergehalt an. Da nun Michaelis und Rona<sup>2)</sup> mit Hilfe der «Kompensationsmethode» nachgewiesen haben, daß nur ungebundener Traubenzucker im Blute kreist, wäre damit das Ziel erreicht, den Traubenzucker isoliert quantitativ bestimmen zu können. Es war daher weiterhin ein Vergleich zwischen den mit der «Eisenmethode» und mit Phosphorwolframsäure zu erzielenden Werten von großem Interesse. Da anzunehmen war, daß die Gegenwart von Hämoglobin diese Aufgabe unnötig erschweren würde, anderseits durch den Versuch 14, Tabelle II bereits nachgewiesen ist, daß die linksdrehende Substanz im wesentlichen dem Serum angehört, so wurde zu diesen Versuchen Serum vom Rind gewählt. Bei dem folgenden Versuche 16, Tabelle II, dessen Phosphorwolframsäureausfällung durch einen Unfall leider verloren ging, ist nun wieder bemerkenswert, daß die nach der «Eisenmethode» ausgefällte Lösung des Rinderserums auf ca.  $\frac{1}{5}$  des Serumvolumens eingengt, gegen Lackmus neutral reagierte und nur rechtsdrehende, vergärbare, reduzierende Substanz, auf Traubenzucker bezogen 0,062% enthielt. Das Fehlen linksdrehender Substanz wurde in unseren Versuchen beim Pflanzenfresser bisher nicht beobachtet, wenn mit Phosphorwolframsäure das Eiweiß entfernt wurde. Eine Wiederholung des Versuches, Nr. 17 a—c, Tabelle II und III, ergab im Filtrat der Eiseneiweißfällung gegen Lackmus neutrale Reaktion, als es aber bis auf ca.  $\frac{1}{5}$  des angewandten

<sup>1)</sup> Bioch. Zeitschrift, Bd. XVI, S. 65.

<sup>2)</sup> Bioch. Zeitschrift, Bd. XIV, S. 476.

Serumvolumens eingeengt wurde, war ganz schwach saure Reaktion nachweisbar, obwohl ein Zusatz von Essigsäure unterblieben war. Die Ausflockung war erst eingetreten, nachdem kleine Mengen  $K_2SO_4$  hinzugefügt worden waren. Die polarimetrische Bestimmung ergab für 17 a und b identische Werte, die Reduktionsbestimmung von 17 b den gleichen Wert. Durch den Ausfall des Gärungsversuchs 17 a Tabelle II wird weiterhin bewiesen, daß der ganze Betrag vergärbare Substanz auf Rechnung der rechtsdrehenden, reduzierenden Substanz zu setzen ist und daß neben dieser keine weiteren optisch aktive, reduzierende, vergärbare Substanzen vorhanden sein können. Damit ist wiederum bewiesen, daß nur Traubenzucker vorliegen kann. Der Phosphorwolframsäureversuch zeigt dagegen eine zwar nicht erhebliche, aber deutliche Differenz zwischen den aus Polarisation und Reduktion ermittelten Zuckerwerten: die nach den bisherigen Auseinandersetzungen auf der Anwesenheit linksdrehender Substanz beruhen muß. Für einen entsprechenden Gärungsversuch war nicht mehr genügend Material vorhanden. Das Filtrat des Eiweiß-Phosphorwolframsäureniederschlags zeigte vor Zusatz des Bleiacetats eine eben erkennbare, saure Reaktion, die nach dem Einengen stärker wurde. Kongopapier wurde jedoch nicht gebläut. Der Versuch ist also auch hier im Sinne der obigen Deutung ausgefallen. Über die saure Reaktion des Filtrats von 17 a und b wird noch zu sprechen sein.

Um das Resultat noch sicherer zu stellen, wurden im Versuch 18 a und b, Tabelle III, je 100 g Serum verarbeitet. Die polarimetrischen Ausschläge sind infolgedessen so groß, daß Irrtümer ausgeschlossen sind. Um einen Begriff von dem im Filtrate der Eiweißfällung herrschenden Säuregrad zu bekommen, wurden von beiden Filtraten je 10 ccm entnommen. Das Filtrat 18 a reagierte gegen Lackmus neutral, dasjenige von 18 b sauer.

Es gebrauchen von

a) 10 ccm < 1 Tropfen  $\frac{1}{10}$ -norm.-NaHO

b) 10 ccm 0,9 ccm  $\frac{1}{10}$ -

bis zum Eintritt der alkalischen Reaktion.

Es war in diesem Versuch also zwar nicht geglückt, durch Anwendung der Eisenmethode das Auftreten der linksdrehenden Substanz völlig zu verhindern, aber der Unterschied gegenüber der Phosphorwolframsäureausfällung tritt deutlich zutage.

Aus diesen Versuchen folgt demnach jedenfalls mit Sicherheit, daß zwischen dem Auftreten der linksdrehenden Substanz und der Reaktion der Lösung eine Beziehung besteht der Art, daß saure Reaktion das Auftreten der linksdrehenden Substanz begünstigt. Zugleich zeigt der letzte Versuch aber auch, daß die Eisenmethode sich zurzeit selbst bei Verwendung von Serum noch nicht so dosieren läßt, daß die isolierte Bestimmung des Traubenzuckers mit Sicherheit gelingt. Es ist das ja auch völlig verständlich nach dem, was über den Chlorgehalt der Eisenhydroxydlösung festgestellt werden konnte. Das richtige Maß bezüglich der anzuwendenden Eisenmenge einzuhalten, d. h. das Eiweiß unter Bindung der Salzsäure völlig auszufällen und gleichzeitig durch Vermeidung eines Überschusses unterhalb derjenigen Aciditätsgrenze zu bleiben, welche, wenn überschritten, zum Auftreten der linksdrehenden Substanz führt, ist zur Zeit noch Sache des Zufalls.

Es wäre eine dankenswerte Aufgabe, die Methode der Eiweißausfällung mit Hilfe von kolloidalen Stoffen nach dieser Seite hin zu vervollkommen. Vielleicht könnte die Verwendung reiner Metallsole besser zum Ziele führen.

Auf Grund der soeben gewonnenen Erfahrungen dürfte hingegen ein zweiter Weg vielleicht einstweilen gangbar sein. Wenn wirklich die linksdrehende Substanz eine Säure ist, so müßte sich durch Zusatz einer stärkeren Säure schließlich ein Punkt erreichen lassen, wo durch weiteren Säurezusatz die Menge der linksdrehenden Säure sich nicht weiter steigern läßt. Es wurde nun bereits erwähnt, daß eine mäßige Überschreitung desjenigen Minimums an Phosphorwolframsäure, welches zur völligen Enteiweißung erforderlich ist, den Zuckerwert nicht verändert. Wurde ferner zur Ausfällung der überschüssigen Phosphorwolframsäure die doppelte Menge Bleiacetat angewandt, so trat gleichfalls keine Änderung der Zuckerwerte

ein. Ist diese Überlegung richtig, so müßte anderseits eine starke Verminderung der Acidität bei Anwendung von Phosphorwolframsäure zu Ergebnissen führen, die denjenigen der zuletzt abgehandelten Versuche mit der Eisenmethode ähnelten. Konstanz der Linksdrehung aber trotz zunehmender Acidität würde demnach bedeuten, daß die Bestimmung der linksdrehenden Substanz unter den jeweiligen Versuchsbedingungen quantitativ ist. Einen Versuch in dieser Richtung stellt der Versuch 19 dar. Es wurden angewandt:

	Rinderoxalatblut	Wasser	10 <sup>o</sup> Phosphorwolframsäure
19 a	50	1000	60
b	50	1000	50

In b stellen 50 ccm Phosphorwolframsäure dasjenige Minimum dar, welches zur Enteiweißung eben genügte und gerade noch die Filtration nach der Eiweißausfällung gestattete. An Stelle des Bleiacetats wurden beide Filtrate mit alkali- und säurefreiem Bleiacetat (Kahlbaum) versetzt und auf der Maschine solange geschüttelt, bis eine Entwicklung von Kohlensäure nicht mehr bemerkbar war. Es waren etwa 8 Stunden erforderlich. Die Flüssigkeit war nach dem Absitzen des überschüssigen Bleicarbonats milchig getrübt und nicht filtrierbar. Erst nach Zusatz von 3 Tropfen 3%iger Essigsäure fiel die Trübung als weißer Niederschlag aus, nach dessen Absitzen glatt filtriert werden konnte. Beim Einleiten von Schwefelwasserstoff bildete sich wiederum kein Niederschlag, sondern die Lösung wurde schwarzbraun und lief durch das Filter ungeklärt durch. Erst als nach Zusatz geringer Mengen neutralen Bleiacetats wiederum Schwefelwasserstoff eingeleitet wurde, fiel das Schwefelblei aus. Das bleifreie Filtrat reagierte nach Verjagen des H<sub>2</sub>S im Luftstrom trotzdem neutral und ließ auch keine saure Reaktion erkennen, als es bis auf ca. 1/5 des ursprünglichen Blutvolumens eingeengt wurde.

Die polarimetrische Bestimmung ergab in

a : c = 9,68 ccm eine Drehung  $\alpha = -0,05^{\circ}$ , die Bertrand'sche Bestimmung 0,048% Zucker.

$b : c = 9,60 \text{ ccm} \pm 0,08^0$ , die Bertrandsche Bestimmung  $0,056^0\%$  Zucker.

Der Versuch zeigt also ganz eindeutig, daß die bisher bei der Ausfällung mit Phosphorwolframsäure beobachtete Übereinstimmung der polarimetrischen Werte verloren gegangen ist und Verhältnissen Platz gemacht hat, die in der Tat denjenigen der letzten Versuchsreihe gleichen. Zugleich zeigt der Versuch, daß der Schwellenwert für das Auftreten der linksdrehenden Substanz einer sehr niedrigen H-Ionenkonzentration entsprechen muß.

Das Schlußglied in der Beweiskette bringt der Versuch 5 a b, Tabelle I, am Blute des Polycytämiekranken. Es wurden wieder angewandt in:

	Blut	Wasser	10% Phosphorwolframsäure
5 a	50	1000	58
b	50	1000	88

Die Bleiacetatmenge betrug in beiden Versuchen 20 ccm der 10%igen Lösung.

Die Reaktion des Filtrats von a war gegen Lackmus?

„ „ „ „ b „ schwach sauer.

Die Reaktion der eingengten Lösung von

a war sauer, gegen Kongopapier negativ.

b „ „ „ „ „ „

Die Zuckerwerte zeigen bei der polarimetrischen Bestimmung fast die gleichen Zahlen, die Bestimmung nach Bertrand annähernd übereinstimmende Werte; die Differenz liegt allerdings an der oberen Grenze des Fehlerbereichs der Methode, und es muß deshalb auch mit der Möglichkeit gerechnet werden, daß wirklich eine Vermehrung der reduzierenden Substanz, z. B. durch Aufspaltung von in gepaartem Zustande nicht reduzierender Glukuronsäure, als Folge des angewandten Verfahrens eingetreten ist. Dagegen spricht aber, daß in Versuch 9 a—c, Tabelle I, die Enteiweißung nach dem Verfahren von Schenck für die reduzierende Substanz den gleichen Wert ergibt, wie die Enteiweißung mit Phosphorwolframsäure, trotzdem im ersten

Falle die Lösung so stark sauer reagierte, daß Kongopapier intensiv blau gefärbt wurde.<sup>1)</sup>

Im großen und ganzen ist demnach der zugrunde gelegte Gedanke durch den Ausfall der Versuche als richtig bestätigt worden, wenn auch im einzelnen eine völlige Übereinstimmung noch nicht erzielt worden ist. Sieht man davon ab, daß in Versuch 17a und b der Reaktion der konzentrierten Lösung der Ausfall der polarimetrischen Bestimmung nicht völlig entspricht, da außer der Reaktion noch Bedingungen in Betracht kommen könnten, die wir zurzeit noch nicht übersehen, so lassen sich doch auf keinen Fall die Differenzen übergehen, welche zwischen den chemischen Eigenschaften einer linksdrehenden Säure und denen der verschiedenen, linksdrehenden Körper bestehen, welche andere Forscher<sup>2)</sup> im Blute neben Traubenzucker bisher gefunden haben. Sind auch diese Substanzen zum Teil als chemische Individuen noch nicht anerkannt, so darf doch soviel aus den bisherigen Untersuchungen geschlossen werden, daß die Linksdrehung nicht durch die Annahme einer einheitlichen Substanz erklärt werden kann. Darauf würde der Befund einer linksdrehenden Säure aber doch zunächst hinweisen. Bevor daher diese Widersprüche nicht aufgeklärt sind, kann die gegebene Erklärung als bewiesen nicht gelten. Eine weitere Klärung ist aber nur durch Verarbeitung großer Blutmengen zu erwarten und das nächste Ziel muß die Isolierung der linksdrehenden Substanz sein.

Mit Sicherheit haben jedoch die vorstehenden Versuche ergeben, daß die Enteiweißung mit Phosphorwolframsäure in einer Reihe von Fällen die quantitative Bestimmung des Traubenzuckers im Blute zuverlässig ermöglicht, und auch in den Fällen, wo die quantitative Bestimmung noch nicht möglich ist, nach den bisherigen Versuchen wenigstens zu vergleichbaren, relativen Werten führt. Die Untersuchungen werden im Sinne der

<sup>1)</sup> Anmerkung: Um die Bertrandsche Bestimmung anwenden zu können, war eine kleine Abweichung von Scheneks Vorschrift erforderlich. Die eingeengte Lösung wurde nicht auf das Volumen der angewandten Blutmenge, sondern nur auf ca. 20 cem gebracht.

<sup>2)</sup> Hammarsten, Lehrbuch der physiol. Chemie, 1907, S. 184.

vorstehenden Ausführungen fortgeführt und sollen gleichzeitig auf pathologische Fälle ausgedehnt werden.

### Zusammenfassung.

Zur Enteiweißung von Blut (Blutkörperchen) zwecks quantitativer Bestimmung des Traubenzuckers verdient die Phosphorwolframsäure den Vorzug. Da sie die gleichzeitige Bestimmung durch Polarisation, Gärung und Reduktionsmethoden ohne weiteres gestattet, ist in einer Reihe von Fällen die quantitative, in den übrigen die relative Bestimmung des Traubenzuckers möglich. Von den Reduktionsmethoden ist das Verfahren von Bertrand besonders geeignet. Linksdrehende Substanz findet sich nicht selten in erheblicher Menge und ist deshalb bei der Zuckerbestimmung zu berücksichtigen, so lange die Isolierung des Traubenzuckers nicht gelingt. Versuche machen es wahrscheinlich, daß die linksdrehende Substanz eine Säure ist. Die Eiweißausfällung mit Phosphorwolframsäure ergibt bisher auch hinsichtlich der linksdrehenden Substanz vergleichbare (quantitative?) Werte.

Die Untersuchungen wurden im Oktober 1908 im physiologischen Institut der tierärztlichen Hochschule in Berlin begonnen und nach längerer Unterbrechung im Laboratorium der II. medizinischen Klinik in München fortgeführt. Herrn Prof. Abderhalden und Herrn Prof. Friedr. Müller spreche ich für die mir so freundlich gewährte Unterstützung meinen herzlichsten Dank aus.