

# Über die Bestimmung des Blutzuckers.

Von

Ivar Bang, H. Lyttkens und J. Sandgren.

(Aus dem med.-chemischen Institut der Universität Lund.)

(Der Redaktion zugegangen am 26. März 1910.)

In den letzten Jahren sind aus dem hiesigen Institut mehrere Arbeiten über das Verhalten des Blutzuckers publiziert worden (Bang, Ljungdah. und Bohm,<sup>1)</sup> N. Andersson<sup>2)</sup> und A. Erlandsen<sup>3)</sup> neben andern noch nicht veröffentlichten Arbeiten über dasselbe Thema). Bei allen diesen Untersuchungen sind die Methoden zur Blutzuckerbestimmung hier ausgearbeitet und später verbessert worden. Zuletzt ist man zu einer Methodik gekommen, welche jede berechtigten Ansprüche an Einfachheit und Genauigkeit erfüllt und, wie es bei vergleichenden Untersuchungen scheint, in diesen Beziehungen den übrigen Methoden den Rang streitig machen kann.

Die erste hiesige Methode war eine Vereinfachung des Abelesschen Verfahrens, indem die Trennung des zuckerhaltigen Alkoholextraktes von den Eiweißkoageln durch Verwendung der Zentrifuge geschah (Bang).<sup>4)</sup> Später wurde die Reinigung des Alkoholextraktes mit Kaolin anstatt Zinkacetat eingeführt (Bang).<sup>5)</sup> Hierdurch bekommt man eine schwach gelbgefärbte Lösung, welche sich nach Bangs Zuckerbestimmungsmethode genügend scharf titrieren läßt.

Eine weitere Verbesserung war die Reinigung durch kolloidales Eisenoxyd (Erlandsen), wodurch man gewöhnlich ein farbloses oder nur sehr schwach gelbgefärbtes Filtrat bekommt, welches sich noch schärfer titrieren läßt. Nach Titration mit Hydroxylamin bekommt man eine farblose oder äußerst schwach gelbgefärbte Lösung. Im letzten Falle wird

<sup>1)</sup> Bang, Ljungdahl und Bohm. Beiträge z. chem. Physiol. und Pathol., Bd. IX—X, 1907.

<sup>2)</sup> N. Andersson. Biochem. Zeitschrift, Bd. XII, S. 1, 1908.

<sup>3)</sup> Erlandsen, Biochem. Zeitschrift, Bd. XXIII, S. 329, 1910.

<sup>4)</sup> Bang, Hammarsten-Festschrift, Nr. 2, 1906.

<sup>5)</sup> Bang, Biochem. Zeitschrift, Bd. VII, S. 327, 1908; Bd. XI, S. 538, 1909.

die Kupferlösung erst grünlich-blau. Durch 2—3 Tropfen Hydroxylaminlösung bekommt man den Umschlag. Es ist also absolut nicht die geringste Schwierigkeit bei diesem Verfahren, den Blutzucker genau zu bestimmen, wie auch z. B. Erlandsens Kontrolluntersuchungen zeigen können.

Zu ganz andern Ergebnissen ist Oppler<sup>1)</sup> bei Verwendung von Bangs Titrationsmethode gekommen, indem er keine übereinstimmenden Werte erzielen konnte. Und die Ursache hierfür ist nach Oppler, daß eine gelbgrüne Zwischenfärbung eintritt. (Daß das Ergebnis stark (!) von der Titrationsdauer abhängt, ist nicht richtig, wenn man das vorgeschriebene Teilmaximum nicht überschreitet.) Oppler hat nun bei seinen Bestimmungen nicht die Alkoholmethode verwendet, sondern entweißte das Blut nach Verdünnung mit Wasser mit Eisen und konzentrierte das Filtrat stark. Nach unseren Erfahrungen ist dies nicht zu empfehlen (worüber näheres später). Er bekam eine schwach gelbliche Lösung, mit welcher er die Titrationen anstellte. Ein Vergleich der Versuche 1, 3 und 4 (S. 394—395) zeigt, daß 10 ccm Zuckerlösung 43,2 und 44,3 mg und 7 ccm 30,4 und 30,5 mg Dextrose entsprachen, welche Werte mit den berechneten gut übereinstimmten. Bei Verwendung von 4 ccm Zuckerlösung bekam aber Oppler nur 7,8 und 10,2 mg Dextrose anstatt der berechneten 17,4 mg. Diese berechnete Menge entspricht 31,0 ccm Hydroxylaminlösung, während Oppler 40,8 und 38,2 ccm verbrauchte. Also nicht weniger als 9 ccm Hydroxylaminlösung zu viel. Da nun andererseits Oppler 7 ccm und 10 ccm Zuckerlösung genügend scharf titrieren kann, und da man weiter ebenso genau 10—20 mg Dextrose wie 30—50 mg titriert (eine eventuelle Mischfärbung tritt doch mehr bei größeren als bei kleineren Flüssigkeitsmengen hervor), ist dies Ergebnis ganz unverständlich. Man kann ohne weiteres davon ausgehen, daß einige Versuchsfehler vorgelegen haben. Unverständlich bleibt nur, daß Oppler mit den gefundenen Werten sich zufrieden gestellt und sie als Belege publiziert hat. Aus diesem Grunde können wir auch seiner Versuchsserie 2 keine Bedeutung zumessen.

<sup>1)</sup> Oppler, Diese Zeitschrift, Bd. LXIV, S. 393, 1910.

Wenn aber Oppler bei Titration reiner Zuckerlösungen seine Zufriedenheit der Methode ausspricht, läßt sich diese Forderung auch erfüllen, und zwar durch Einführung des von Bang und Bohmannson<sup>1)</sup> ausgearbeiteten Verfahrens zur Bestimmung des Harnzuckers: Die Entfärbung durch Blutkohle und Salzsäure. Durch diese Modifikation erhält man ein ganz klares, farbloses Filtrat, welches sich ebenso scharf wie eine reine Zuckerlösung titrieren läßt. Beim Vergleich mit der Eisenmethode (welche nach unseren Erfahrungen sich übrigens sogar sehr gut bewährt hat) muß man unbedingt der Kohlenmethode den Vorzug geben. Will man aber die Reduktion vor und nach Gärung bestimmen, ist die Eisenmethode vorteilhafter, da nur wenig Kochsalz (und also nicht  $MgSO_4$ , wie Michaelis und Rona jetzt empfehlen) zum Entfernen des Eisenüberschusses notwendig ist, während 5 % HCl der Kohlenmethode viel Salz entspricht.

Eine andere Verbesserung der Methode ist auch zu empfehlen. Obwohl einfacher als Abeles' Verfahren, ist die Zentrifugenmethode keineswegs ideal. Erstens steht ja nicht überall eine Zentrifuge zur Verfügung und zweitens muß man dreimal zentrifugieren, was ziemlich lange dauert und auch Zeit in Anspruch nimmt. Im hiesigen Institut ist deswegen von Ljungdahl eine Vereinfachung ausgearbeitet worden, welche mindestens ebenso genau ist und viel schneller zum Ziele führt (unveröffentlichte Arbeit Ljungdahls). Das Blut wird wie gewöhnlich in Alkohol aufgenommen. Nach der Mischung mit Blut wird der Alkoholextrakt abgenutscht, indem man einen Trichter mit aufgelegter durchlöcherter Porzellanplatte, mit Filtrum versehen, mit der Saugpumpe in Verbindung setzt. Die Lösung geht schnell hindurch, und der ziemlich trockene Blutkuchen wird mit Alkohol wieder zerrieben (man verwendet hierzu am besten einen Pistill), der Alkohol abgenutscht und der Kuchen zum drittenmal mit Alkohol behandelt. Nach einigen Minuten ist die ganze Zuckerextraktion beendet, und die Lösung kann jetzt auf dem Wasserbade eingedunstet werden.

<sup>1)</sup> Bang und Bohmannson, Diese Zeitschrift, Bd. LXIII, S. 443, 1909.

Die vereinigten Alkoholextrakte werden dann stark eingeengt, auf ein bestimmtes Volumen aufgefüllt und mit Blutkohle und Salzsäure oder auch Eisen gereinigt.

Durch die Behandlung mit Kohle und Salzsäure werden nach Bang und Bohmannsson die meisten reduzierenden Stoffe des Harns mit Ausnahme des Zuckers entfernt. Es fragt sich dann, inwieweit solche Stoffe in nachweisbarer Menge im Blute vorkommen. Nach N. Andersson besteht etwa  $\frac{1}{4}$  der Totalreduktion des Blutes aus nichtgärungsfähiger Substanz. Da nun solche Stoffe nach Bohmannsson<sup>1)</sup> durch Eisen nicht entfernt werden können, läßt sich aus vergleichenden Untersuchungen mit der Eisen- und Kohlenmethode eruieren, wie sich die Sache beim Blut verhält, d. h. inwieweit man durch Eisen und Kohle dasselbe Ergebnis erhält oder nicht. In der folgenden Tabelle sind einige solche Versuche zusammengestellt. Die Enteiweißung geschah wie oben bemerkt (durch die Nutsche).

Tabelle I.

Nr.	Blutart	Kohlenmethode %	Eisenmethode %	Differenz %
1	Ochsenblut	0,104	0,118	0,014
2	"	0,035	0,043	0,008
3	"	0,030	0,036	0,006
4	Kaninchenblut	0,112	0,154	0,046
5	"	0,147	0,152	0,005
6	"	0,101	0,106	0,005

Bei Blut Nr. 2 und 3 hatte Glykolyse stattgefunden. Bei Nr. 4 entsprechen die Werte zwei unmittelbar aufeinander folgenden Aderlässen. Bei den übrigen Versuchen wurde der Alkoholextrakt zuletzt geteilt und nach den zwei Methoden verarbeitet.

Das Ergebnis der Versuche ist, daß die Kohlenmethode überall geringere Totalreduktion aufweist, als die Eisenmethode, doch sind die Unterschiede so klein, daß man sie ruhig vernachlässigen kann.

Bemerkenswert ist, daß bei der Kohlenmethode nur sehr

<sup>1)</sup> Bohmannsson, Biochem. Zeitschrift, Bd. LIX, S. 281, 1909.

wenig reduzierende Substanz zum Unterschied des Harns entfernt wird. Dies spricht für die längst hervorgehobene Möglichkeit, daß diese Stoffe Pentose sind. N. Andersson hat auch gezeigt, daß sie eine positive Orcin-Phloroglucinreaktion geben. Daß sie aber auch zum Teil Glukuronsäure entsprechen, geht aus der positiven Tollensschen Reaktion hervor. Bohmannsson hat gezeigt, daß etwa die Hälfte der Glukuronsäure im Harn durch Kohle und Salzsäure entfernt wird (nicht veröffentlichte Untersuchung). Deswegen kann die gärungsunfähige Substanz nur zum Teil der «Pentose» entsprechen. Denn der Unterschied zwischen der Eisen- und Kohlenmethode ist weit kleiner, als die Hälfte der Totalreduktion  $\div$  Traubenzucker, wie Titrationen vor und nach Gärung zeigten. Bei Versuch Nr. 6 wurden vor der Gärung die Werte 0,101 ‰ und 0,106 ‰ gefunden. Die Hälfte der Glukuronsäure sei also 0,005 ‰ und die ganze Menge 0,01 ‰. Nach der Gärung waren die Werte 0,035 ‰ und 0,032 ‰. Der Unterschied ist also geringer, als man erwarten sollte, wenn die Glukuronsäure allein neben Zucker vorlag. Doch sind selbstverständlich bei so geringen absoluten Werten die Ergebnisse nicht ganz beweiseud, und Bohmannssons Ergebnis ist auch nur schätzungsweise gefunden. Wir lassen also diese Frage offen stehen. Dagegen ist ersichtlich, daß man nicht aus der titrimetrischen Bestimmung allein den exakten Traubenzuckergehalt folgern kann, wenn andere reduzierende Stoffe vorkommen. Nach Oppler u. a. ist es mit der polarimetrischen Bestimmung nicht besser bestellt. Das einzig exakte Verfahren ist demnach die Bestimmung der Reduktion vor und nach der Gärung.

Viel wichtiger ist die Frage zu berücksichtigen, in wie weit man durch die Nutschemethode tatsächlich die gesamten reduzierenden Stoffe des Blutes im Alkoholextrakt bekommt. Durch Vergleich mit der Bangschen Zentrifugenmethode hat Ljungdahl das erwiesen. Hier sollen wir zeigen, wie der Vergleich zwischen unserer Methode und der Eisenmethode nach Michaelis und Rona ausgefallen ist. Von dem defibrierten Blut eines Kaninchens wurden 35 ccm nach Michaelis und Rona verarbeitet: Verdünnung auf 700 ccm, Enteiweißung mit

Eisen und Kochsalz, Konzentration des Filtrates bei schwach saurer Lösung. Es resultierten etwa 15 ccm einer gelbgefärbten Flüssigkeit, welche eine kleine Fällung enthielt. Sie wurde deswegen nochmals mit ein wenig Eisen gereinigt. Bei der Titration wurde eine Totalreduktion entsprechend 0,152% des Blutes gefunden. Hierbei ist zu bemerken, daß die Titration schwieriger auszuführen als nach dem Alkohol-Eisenverfahren, welches zum Vergleich mit 30 ccm des Blutes ausgeführt wurde. Ergebnis war 0,152%, genau derselbe Wert wie nach Michaelis und Rona. Wir können aber Oppler verstehen, wenn er die Titration nach Bang bei Michaelis-Ronas Verfahren als schwierig bezeichnet, obwohl er die Schwierigkeiten sehr übertrieben hat. Dagegen ist die Titration des Alkoholextraktes nach Reinigung mit Eisen nicht mit den geringsten Schwierigkeiten verbunden, obwohl wir doch der Kohlenmethode wie bemerkt den Vorzug geben.

Ich hatte Interesse, nachzusehen, wieviel Zucker in das erste und die folgenden Alkoholextrakte bei der Nutschmethode übergeht. Bei dem ersten dieser Versuche wurden 50 ccm Ochsenblut (glykolisiertes Blut mit ca. 0,1% Traubenzucker versetzt) mit 200 ccm Alkohol versetzt und scharf abgenutscht, 221 ccm Filtrat erhalten. Das Residuum wurde mit ca. 50 ccm Alkohol behandelt und abgenutscht. Der Zuckergehalt der getrennten Filtrate wurde bestimmt und zudem die Gesamtreduktion des Blutes nach dreimaliger Alkoholextraktion. In dem zweiten Versuche wurden 30 ccm eines anderen auch glykolisierten mit Traubenzucker versetzten Ochsenblutes mit 150 ccm Alkohol behandelt und abgenutscht, 150 ccm Filtrat erhalten. Die Reduktion des Filtrates wurde bestimmt und zudem dieselbe einer anderen Probe nach dreimaliger Alkoholextraktion. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt.

Wie ersichtlich gehen schon 80% bzw. 89% in das erste Alkoholextrakt über und sind in den beiden ersten Extrakten zusammen 98,4%. Durch eine dreimalige Extraktion, welche in wenigen Minuten ausgeführt ist, kann man deswegen sicher die ganze Zuckermenge auslösen, wie auch die obigen Versuche zeigen.

Tabelle II.

Nr.	Total- reduktion %	Reduktion des 1. Alkohol- extraktes		Reduktion des 2. Alkohol- extraktes	
		absolut %	relativ %	absolut %	relativ %
7.	0,155	0,139	89,7	0,014	8,7
8.	0,155	0,137	88,7	—	—

Das Verfahren, welches wir zur Bestimmung des Blutzuckers empfehlen wollen, gestaltet sich folgendermaßen:

Das Blut — 10—50 ccm — wird in ein mit etwa 150 ccm Alkohol beschicktes, gewogenes Glas aufgefangen. Durch Wägung wird die Blutquantität ermittelt. Man verteilt das Blut mit einem Glasstabe (am besten wägt man das Glas mit dem Glasstab zusammen und zerteilt dann das Blut vor der Wägung). Das Alkoholextrakt wird scharf abgenutscht. Wenn alles durchgegangen ist, spült man mit einigen Kubikzentimetern Alkohol nach und saugt den Alkohol durch. Das ziemlich trockene Residuum wird in das Glas übergeführt und hier mit ca. 50 ccm Alkohol gerieben, indem die Porzellanplatte herausgenommen und mit einem neuen Filter versehen wird. Man saugt das zweite Alkoholextrakt durch und behandelt den Rückstand nochmals mit 50 ccm Alkohol, welcher mit dem ersten vereinigt wird. Der jetzt pulverige Rückstand wird weggeworfen, und die Alkoholextrakte auf dem Wasserbade eingengt. Man führt die Lösung in einen Meßzylinder von 25 ccm über, spült wiederholt mit Wasser nach und ergänzt die Lösung auf 20 ccm (bei wenig Blut 10 ccm). 5 ccm 25% Salzsäure und 2 g Blutkohle (ein gestrichener Teelöffel) wird zugefügt. Man schüttelt einige Male während 5 Minuten um und filtriert durch ein trockenes Filtrum in ein trockenes Proberöhrchen. Inzwischen sind 50 ccm Kupferlösung nach Bang abgemessen. Von dem Filtrate werden 10 ccm hinzugesetzt. Weiter nach Bang. Die ganze Prozedur dauert ca.  $1\frac{1}{2}$  Stunde. Wenn Blutkohle nicht zur Verfügung steht oder wenn Gärungsversuche angestellt werden sollen, ist Eisenoxydlösung (2 ccm auf 20 ccm und einige Tropfen 26% iger NaCl-Lösung) zu empfehlen. Man kann hier den Farbumschlag auf 2—3 Tropfen schätzen.