

(Aus dem Laboratorium für physik.-chem. Biologie der Universität Bern.)

Über die Geschwindigkeit der Reduktion des Methylenblaus durch Glukose und Fruktose und ihre Verwertung in der Harnanalyse.

Von

J. F. Muster und Gertrud Woker.

Die Reduktion des Methylenblaus in alkalischer Lösung ist schon lange zum qualitativen Nachweis von Traubenzucker und Invertzucker benutzt worden, so von Ihl¹⁾, Herzfeld²⁾, Neumann-Wender³⁾, Le Goff⁴⁾, Fröhlich⁵⁾ und Hocke⁶⁾. Die letzteren Arbeiten beziehen sich speziell auf den Nachweis von Zucker im Harn. Auch zur quantitativen Schätzung des Zuckergehaltes ist die genannte Reduktion von Herzfeld (l. c.) herangezogen worden, welcher bei Verwendung einer einpromilligen Methylenblaulösung feststellte, dass eine 0,2 % ige Invertzuckerlösung den Farbstoff in weniger als einer Minute zu entfärben vermag, während 0,01 % ige Invertzuckerlösungen zwei Minuten zu dieser Reaktion bedürfen. Wir haben nun versucht, die Geschwindigkeit der Reduktion als Maass für den Zuckergehalt eines Harnes und insbesondere zur Differenzierung von Traubenzucker und Fruchtzucker im Harn, wenigstens innerhalb gewisser Grenzen, zu benutzen. Denn es war zu erwarten, dass dem Fruchtzucker ein stärkeres Reduktionsvermögen zukommt als dem Traubenzucker, und zwar aus folgendem Grund: Durch die klassische Untersuchung von

1) Ihl, Chemiker-Zeitung Bd. 12 S. 25. Zeitschr. f. analyt. Chemie Bd. 29 S. 368.

2) Herzfeld, Deutsche Zuckerindustrie Bd. 13 S. 234.

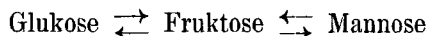
3) Neumann-Wender, Pharm. Post Bd. 26 S. 393. Zeitschr. f. analyt. Chemie Bd. 33 S. 118.

4) Le Goff, Pharm. Zentralhalle Bd. 38 S. 706. 1897. Compt. rend. de la Soc. Biol. t. 58 p. 448. 1905.

5) Fröhlich, Zentralbl. f. innere Medizin Bd. 19 S. 89. 1898.

6) Hocke, Prager med. Wochenschr. 1898 S. 441.

Lobry de Bruyn und Alberda van Ekenstein¹⁾ ist die wechselseitige Umlagerung von Glukose, Fruktose und Mannose nach dem Schema:



festgestellt worden, und ferner ist bekannt, dass der Traubenzuckerabbau über den leichter zersetzlichen Fruchtzucker geht²⁾. Die Umlagerung der Dextrose in Lävulose erfordert nun aber eine gewisse Zeit, weshalb bei der Reaktion dieser beiden Zucker mit Methylenblau die Lävulose einen Vorsprung gewinnen muss. Diesen Voraussetzungen entsprechend hat auch schon die eine von uns gemeinsam mit Dr. Elisabeth Belencki ein ungleiches Reduktionsvermögen der beiden Zucker gegenüber Methylenblau nachgewiesen.

Die Verwendung der ungleichen Reduktionszeit des Methylenblaus unter dem Einfluss von Glukose und Fruktose zur Unterscheidung und eventl. Bestimmung dieser Zucker schien uns wünschenswert zu sein, weil selbst der qualitative Nachweis des Fruchtzuckers auf Schwierigkeiten stösst, besonders für den praktischen Arzt, der über keinen Polarisationsapparat verfügt; denn die Seliwanoff'sche Probe ist wegen der leichten Umlagerung des Traubenzuckers in Fruchtzucker in keiner der angegebenen Modifikationen unbedingt zuverlässig, und der Nachweis der Fruktose mit Hilfe des Methylphenylhydrazins oder des Kalkhydrats ist für den Mediziner zu umständlich.

Um das Reduktionsvermögen der beiden auf ihren Einfluss zu prüfenden Stoffe gegeneinander abzuwägen, standen zwei Wege offen. Man konnte die Zeiten gleichen Umsatzes, d. h. in dem vorliegenden Fall die Zeiten bis zur völligen Entfärbung des Methylenblaus miteinander vergleichen, oder man konnte die Verdünnung ausfindig machen, bei welcher die Lävulose eine Methylenblaulösung von bestimmtem Gehalt in der nämlichen Zeit reduziert wie eine Glukoselösung von bekannter Konzentration.

1) Lobry de Bruyn et Alberda van Ekenstein, Rec. trav. chim. Pays-Bas t. 14 p. 156, 203. 1895, t. 16 p. 262. 1897. Ber. d. chem. Gesellsch. Bd. 28 S. 3078. 1895.

2) Wohl, Ber. d. chem. Gesellsch. Bd. 33 S. 3093. 1900; s. auch Wohl, Biochem. Zeitschr. Bd. 5 S. 45. 1907. — Schade, Zeitschr. f. physik. Chemie Bd. 57 S. 1. 1907; Biochem. Zeitschr. Bd. 7 S. 299. 1908. — Buchner und Meisenheimer, Ber. d. chem. Gesellsch. Bd. 37 S. 422. 1904; Bd. 39 S. 3201. 1906.

Wir beschränkten zunächst den ersten Weg, indem wir die Reduktionszeiten gleichprozentiger Trauben- und Fruchtzuckerlösungen aufsuchten.

Je 2 ccm Harn wurden mit 2 ccm einer Zuckerlösung von bestimmtem Gehalt, 2 ccm 15 %iger Natronlauge und 2 ccm einer $\frac{1}{2}$ %igen Methylenblaulösung versetzt, und zwar wurden gleichzeitig eine Probe mit Glukose, eine mit Fruktose und eine mit 2 ccm Wasser an Stelle der Zuckerlösung (als Kontrolle) angestellt.

Die Resultate dieser vergleichenden, mit wechselnden Zuckermengen und normalen sowie pathologischen Harnen ¹⁾ angestellten Versuche ergeben sich aus folgenden Tabellen:

Versuchsreihe I.

Zusatz von 2 ccm einer 2 %igen Zuckerlösung zu drei normalen Harnen.

	Glukose	Fruktose	Kontrolle
Harn 1 entfärbt nach . .	6 h 30'	1 h 05'	unverändert nach 24 h
" 2 " " . .	8 h 30'	1 h 10'	" " 24 h
" 3 " " . .	6—8 h	2 h 00'	" " 24 h

(Siehe Versuchsreihe II und III auf folgender Seite.)

Aus allen Versuchen geht demnach hervor, dass die Reduktionskraft der Fruktose beträchtlich grösser ist als diejenige der Glukose, und zwar ergibt sich aus den Versuchen, die einen quantitativen Vergleich gestatten, im Mittel ein sechs- bis siebenmal grösseres Reduktionsvermögen des Fruchtzuckers gegenüber der Methylenblaulösung in der verwendeten Konzentration. Einzig Harn 3 (Versuchsserie I), der zwar von einer normalen Person stammt, aber nach einer starken, körperlichen Anstrengung (Bergtour) entleert wurde und durch ausgedehnte Phosphate sehr stark getrübt war, zeigte ein geringeres

1) Die ungleichartigsten pathologischen Harne wurden in die Untersuchung gezogen, um die Reduktionskraft von Glukose und Fruktose unter den verschiedensten, praktisch im Bereich der Möglichkeit liegenden Bedingungen zu vergleichen; denn der veränderte Gehalt eines Harns an irgendeiner bestimmten Substanz (Harnstoff, Harnsäure, Kreatin, Kreatinin, Indikan, Phosphaten, Medikamenten oder des die Diazoreaktion gebenden Körpers usw.) konnte vielleicht die Reduktionsfähigkeit von Glukose und Fruktose ungleichsinnig beeinflussen. Vor allem haben wir nach dieser Richtung hin einen Quecksilbergehalt des Harns Beachtung geschenkt (vgl. die Arbeit von Woker und Belencki, Pflüger's Arch. Bd. 155 S. 45. 1913).

Versuchsreihe II.

Zusatz von 2 ccm einer 2% igen Zuckerlösung zu sieben pathologischen Harnen.

	Glukose	Fructose	Kontrolle
Harn 4 ¹⁾ . .	entfärbt nach 7—8 h	entfärbt nach 1 h 30'	unverändert nach 7 h
" 5 ²⁾ . .	6 h 30'	1 h 00'	wenig entfärbt nach 6 h 30'
" 6 ³⁾ . .	noch etwas gefärbt nach 6 h 30'	1 h 15'	entfärbt sehr wenig nach 6 h 30'
" 7 ⁴⁾ . .	6 h 30'	1 h 15'	unverändert nach 6 h 30'
" 8 ⁵⁾ . .	noch gefärbt nach 1 h 15'	1 h 15'	" " 1 h 15'
" 9 ⁵⁾ . .	1 h 15'	1 h 15'	" " 1 h 15'
" 10 ⁵⁾ . .	1 h 15'	1 h 15'	" " 1 h 15'

Versuchsreihe III.

Zusatz von 2 ccm einer 1% igen Zuckerlösung zu einem normalen und einem pathologischen Harn.

	Glukose	Fructose	Kontrolle
Harn 11 (normal). . . .	noch gefärbt nach 5 h	entfärbt nach 2 h 30'	unverändert
Harn 12 (eiweisshaltig) .	7 h	2 h 00'	"

Reduktionsvermögen der in ihm gelösten Fructose. Es sei noch hinzugefügt, dass als vollkommene Entfärbungszeit der Moment angenommen wurde, in dem die Lösung wie der Niederschlag, der sich in den farbstoffhaltigen Proben in allen Fällen in grösserer oder geringerer Menge (je nach der Versuchszeit) abgeschieden hatte, entfärbt waren.

Zu ungefähr demselben Resultat führte auch die zweite Methode des Vergleichs der Reduktionskraft der beiden Zucker. Auch hier wurden in jedem Fall 2 ccm Harn, 2 ccm 15% iger Natronlauge und 2 ccm $\frac{1}{2}$ % iger Methylenblaulösung verwendet. Das so zu-

- 1) Harn eines dreijährigen Kindes mit alimentärer Albuminurie.
- 2) Pleuritis (Fieberharn).
- 3) Luetikerharn eines mit Kalomel behandelten Patienten.
- 4) Perniciöse Anämie (Fieberharn).
- 5) Luetikerharn eines mit Quecksilberpyridin (Kolle-Scheitlin) Behandelten.

sammengesetzte Gemisch wurde einerseits mit 2 ccm einer 2%igen Glukoselösung, anderseits mit je 2 ccm einer 0,5%igen, einer 0,25%igen und einer 0,1%igen Fruktoselösung sich selbst überlassen.

Am schnellsten entfärbte der mit $\frac{1}{2}$ %iger Lävuloselösung, am langsamsten der mit $\frac{1}{10}$ %iger versetzte Harn, während die Entfärbungsgeschwindigkeit des mit 0,25%iger Fruktoselösung vermischten Harns derjenigen der mit 2%iger Glukoselösung versetzten Probe sehr nahe kam, ohne sie jedoch völlig zu erreichen. Die Fruktose würde demnach unter den angegebenen Bedingungen ein Reduktionsvermögen gegenüber der $\frac{1}{2}$ %igen Methylenblaulösung besitzen, welches sechs- bis achtmal grösser ist als dasjenige der Glukose.

Die Konzentration des Methylenblaus ist jedoch von Einfluss auf das gegenseitige Verhältnis des Reduktionsvermögens der beiden Zucker. Eine 0,2%ige Methylenblaulösung vermochte durch eine 0,25%ige Fruktoselösung in 2 Stunden nicht entfärbt zu werden; erst eine $\frac{1}{2}$ %ige Fruchtzuckerlösung war gleich einer 2%igen Traubenzuckerlösung hierzu imstande. Eine Vermehrung der Konzentration des Methylenblaus scheint dagegen umgekehrt erhöhend auf die Differenz im Reduktionsvermögen der beiden Zucker einzuwirken, wenigstens war nach $1\frac{1}{2}$ Stunde die Entfärbung in der mit 0,5%iger Fruktoselösung beschickten Probe viel weiter geschritten als bei allen übrigen. Doch konnten wegen der intensiven Färbung und wegen des massigen Niederschlags feinere Nuancedifferenzen zwischen der Glukoselösung und den beiden verdünntesten Fruktoselösungen (0,25 und 0,1%) nicht wahrgenommen werden. Konzentriertere Methylenblaulösungen als 0,5% lassen sich daher ebensowenig wie verdünntere für die vergleichende Prüfung des Harns auf Glukose und Fruktose heranziehen.
