Aus dem Institut für medizinische Diagnostik in Berlin.

Zur Mikrobestimmung des Blutzuckers.

Von Dr. A. Kowarsky.

Die von mir im Jahre 1913 in dieser Wochenschrift veröffentlichte Methode zur Bestimmung des Traubenzuckers in kleinen Blutmengen hat sich, wie die Nachprüfungen von Wolff, Strauss u. a. gezeigt haben, gut bewährt. - Wenn sie jedoch bis jetzt keine allgemeine Verwendung in der klinischen Praxis gefunden hat, so läßt sich dies dadurch erklären, daß die Methode zu kompliziert erscheint und für den in chemischer Technik weniger Geübten manche Schwierigkeiten bietet. Ich habe mich daher bemüht, sie möglichst zu vereinfachen, wobei es mir auch gelungen ist, sie nicht unwesentlich zu verbessern.

Der Beschreibung der veränderten Methodik möchte ich einige Bemerkungen zur Begründung der vorgenommenen Veränderungen vorausschicken.

Meine Methode beruht bekanntlich auf dem Bertrandschen Prinzip. Es besteht darin, daß die zu untersuchende Zuckerlösung mit alkalischer Kupferoxydlösung gekocht wird, worauf das aus-

geschiedene Kupferoxydul von der Flüssigkeit getrennt und in saurer Eisensulfatlösung aufgelöst wird; das dabei entstandene Eisenoxydul (das dem Kupferoxydul äquivalent ist) wird durch Titration mit Kaliumpermanganat bestimmt. Damit beim Arbeiten mit kleinen Zuckermengen keine Verluste entstehen, wird der Kupferlösung eine bestimmte Menge Zucker zugesetzt, die von der erhaltenen Menge abgezogen wird.

Um die Resultate dieser und ähnlicher Methoden richtig zu beurteilen, muß man in Betracht ziehen, daß wir es hier nicht mit einer zum Abschluß kommenden Reaktion zu tun haben, sondern daß wir die Reaktion in bestimmtem Stadium unterbrechen. Wie E. Pflüger nachgewiesen hat, sind auch nach dem Unterbrechen des Kochens zwei verschiedene Reaktionen in der Flüssigkeit vorhanden: die noch hohe Temperatur genügt, um neues Kupferoxydul zur Ausscheidung zu bringen; andererseits löst der zutretende atmosphärische Sauerstoff gefälltes Kupferoxydul wieder auf. Will man also bei diesen Methoden genaue Resultate erhalten, so müssen die Bestimmungen immer unter denselben Bedingungen ausgeführt werden.

In erster Linie müssen die Reagentien immer von der gleichen Beschaffenheit sein. Meine in dieser Richtung angestellten Untersuchungen haben gezeigt, daß von den vier Lösungen, die bei der Bertrand'schen Methode angewandt werden, nur drei gut haltbar sind, die vierte dagegen, nämlich die alkalische Seignettesalzlösung, sich leicht verändert, und zwar in dem Sinne, daß sie reduzierend zu wirken beginnt, wodurch die Menge des ausgeschiedenen Kupferoxyduls resp. Zuckers erhöht wird. Schon Pflüger hat gezeigt, daß beim Kochen von Zuckerlösungen mit der Fehling'schen Flüssigkeit außer der Kupferoxydulmenge, die genau der Zuckermenge proportional ist, sich noch eine geringe Menge Kupferoxydul ausscheidet, die durch die Selbstreduktion der Kupferlösung entsteht und die immer nur von der Menge der benutzten Lösung abhängig ist. Es ist klar, daß diese Selbstreduktion nur durch die Seignettesalzlösung bedingt sein kann. Es ist sehr leicht festzustellen, daß beim Stehen dieser Lösung die Selbstreduktion sich bedeutend vergrößert. Ich habe gefunden, daß nach sechs Monaten diese Selbstreduktion so stark wird, daß sie 0,03 bis 0,05% Zucker entspricht. Man wird also bei Benutzung alter Lösungen falsche Resultate erhalten, wenn diese Eigenschaft der Seignettesalzlösung nicht berücksichtigt wird. Bei der neuen Methodik benutze ich daher nur frisch hergestellte Seignettesalzlösung. Um das Erhitzen des Reaktionsgemisches gleichmäßig zu gestalten, habe ich das Kochen durch Erwärmen im Wasserbade ersetzt. Es hat sich gezeigt, daß bei derjenigen Flüssigkeitsmenge (9 ccm), die bei meiner Methode angewandt wird, durch Erwärmen in siedendem Wasser im Laufe von fünf Minuten dasselbe Resultat erzielt wird, wie durch Kochen im Laufe von drei Minuten. Man hat aber dafür den Vorteil, daß die Konzentration der Lösung die ganze Zeit die gleiche bleibt und außerdem Verluste durch Verspritzen völlig ausgeschlossen sind.

Das Arbeiten mit dem Asbestfilter birgt für den weniger Geübten manche Gefahren: einerseits kann ein Teil des Kupferoxyduls infolge nicht sachgemäßer Herstellung des Filters verloren gehen, andererseits kann bei ungeschicktem Auswaschen Luft durchgesaugt werden, wobei ein Teil des Kupferoxyduls in Oxyd umgewandelt werden kann. Ich habe daher vorgezogen, die Absorption des Kupferoxyduls mittels der Zentrifuge auszuführen, da Kontrollversuche gezeigt haben, daß die Resultate ebenso genau sind, wie beim Filtrieren durch Asbest.

Eine weitere Verbesserung wurde durch Aenderung des Enteiweißungsverfahrens erreicht. Die Enteiweißung mit kolloidaler Eisenlösung hat den Nachteil, daß der Eiweißniederschlag so voluminös ist, daß nur die Hälfte der Gesamtmenge zur Bestimmung benutzt werden kann. Außerdem wird durch Zusatz von Seignettesalz die Konzentration der Flüssigkeit in für die Ausscheidung des Kupferoxyduls ungünstiger Richtung erhöht. Die neue Enteiweißungsmethode besteht aus einer Kombination von Hitze- und Koagulation mit Kaolin-Adsorption bei passender Reaktion der Lösung; es gelingt dabei, relativ größere Filtratmengen zu erhalten und dadurch die für die Bestimmung notwendige Blutmenge zu vermindern. Es wurde auf diese Weise die für die einzelne Bestimmung notwendige Blutmenge von 0,5 auf 0,35 ccm herabgesetzt.

Die Art der Blutentnahme und die Berechnung der Resultate konnten wesentlich vereinfacht werden. Da die Kalpermanganatlösung sich als gut haltbar erwiesen hat, so konnte man auf die Einstellung des Titors dieser Lösung verzichten; ebenso hat sich die Aufstellung einer Tabelle als überflüssig erwiesen, da bei der neuen Methodik in den Grenzen, die für den Blutzucker in Betracht kommen, die verbrauchten Kalpermanganatmengen dem Zuckergehalt direkt proportional sind, sodaß der Zuckergehalt nach einfacher Formel sich berechnen läßt.

Ausführung: Man bringt in ein kleines Spitzgläschen oder Zentrifugenröhrchen eine Spur Natriumfluorid in Pulverform. Mit der Frankschen Nadel wird ein Einstich in die mit Alkohol gereinigte Fingerkuppe gemacht. Etwa 0,5 ccm Blut werden in Gläschen resp. Röhrchen aufgefangen. Während des Einfließens des Blutes wird, um Gerinnung zu vermeiden, mit einem Glasstabe umgerührt. Der Zusatz von Natriumfluorid verhindert

auch die Glykolyse des Blutes, sodaß das auf diese Weise entnommene Blut auch versandt werden kann. Hierauf füllt man ein Reagenzglas aus Jenaer Glas, das zwei Marken, entsprechend 5 und 7 ccm trägt, mit 5 ccm $\frac{1}{100}$ normaler 0,06% iger Essigsäure; mit einer Serumpipette mißt man genau 0,35 ccm des zu untersuchenden Blutes ab und läßt dasselbe in die Essigsäurelösung einfließen; durch wiederholtes Aufsaugen und Ausblasen der Flüssigkeit wird das Blut von der Pipette abgespült. Jetzt wird das Reagenzglas bis zum Kochen erhitzt; gewöhnlich koaguliert dabei infolge eines leichten Säureüberschusses das Eiweiß nicht vollständig; man setzt daher einen Tropfen $\frac{1}{100}$ normaler (0,4% iger) Natronlauge hinzu und kocht nochmals auf. Wird dabei die Flüssigkeit aufgestellt bei gleichzeitiger flockiger Ausscheidung des Eiweißes, so braucht man nicht mehr zu erhitzen; ist es nicht der Fall, so wird noch ein Tropfen zugesetzt und nochmals erhitzt; gewöhnlich braucht man zur völligen Koagulation nicht mehr als zwei bis vier Tropfen NaOH-Lösung zuzusetzen. Hierauf kühlt man das Reagenzglas unter der Wasserleitung ab, setzt eine Messerspitze Kaolin zu und füllt bis zur oberen Marke mit destilliertem Wasser; jetzt wird kräftig umgeschüttelt und durch ein kleines Filterchen (4,0 cm Durchmesser) filtriert; man erhält ein wasserhelles, klares, vollständig eiweißfreies Filtrat. Nun bringt man in ein gewöhnliches Reagenzglas 0,4 g Seignettesalz (man hält abgewogene Dosen vorrätig) 2,0 ccm 15% iger Natriumhydratlösung und 2,0 ccm der Zucker-Kupfersulfatlösung (Traubenzucker 0,1, Kupfersulfat 8,0, destilliertes Wasser bis 200,0), schüttelt gut um, setzt 5,0 ccm des Blutfiltrats hinzu, rührt nochmals um und stellt das Reagenzglas auf fünf Minuten in siedendes Wasser. Hernach kühlt man das Reagenzglas in fließendem Wasser gut ab und entleert den Inhalt ohne Verlust in ein Zentrifugenröhrchen; in das Reagenzglas bringt man etwa 10 ccm destillierten Wassers; die blaue Flüssigkeit wird fünf Minuten zentrifugiert, worauf man sie vorsichtig mittels einer Ballonpipette bis auf einige Tropfen abhebt und fortgießt; man ersetzt sie durch das Wasser aus dem Reagenzglas; in das Reagenzglas kommen neue 10 ccm Wasser; die Flüssigkeit in dem Zentrifugenröhrchen wird nochmals ausgeschleudert (drei bis vier Minuten), das Wasser abgossen (das Kupferoxydul haftet jetzt fest am Boden) und durch das Wasser aus dem Reagenzglas ersetzt; in das Reagenzglas bringt man jetzt 2 ccm der Eisensulfatlösung (Ferrisulfat 10,0, Schwefelsäure 40,0, destilliertes Wasser bis 200). Es wird nochmals drei Minuten zentrifugiert, abgossen und die Eisensulfatlösung in das Zentrifugenröhrchen übergegossen; durch Umrühren mit einem zugespitzten Glasstab bringt man das Kupferoxydul zur Auflösung, worauf die Flüssigkeit in ein kleines, etwa 30 ccm fassendes Erlenmeyersches Kölbchen gebracht wird. Man bringt weitere 2,0 ccm der Eisensulfatlösung in das Reagenzglas, aus demselben in das Röhrchen und schließlich in das Kölbchen; dieses Abspülen wird nochmals wiederholt, sodaß im ganzen ins Kölbchen 6,0 ccm Flüssigkeit gelangen; jetzt wird eine zehnfache Verdünnung (5,0 ccm auf 50,0) der Kalpermanganatlösung hergestellt (StammLösung: Kalpermanganat 1,0, destilliertes Wasser zu 200,0). Diese Lösung bringt man in eine in $\frac{1}{20}$ ccm eingeteilte, 10 ccm fassende Bürette und titriert bis zur bleibenden Rosafärbung. Man bestimmt auf diese Weise, wieviel der Permanganatlösung verbraucht wird, um das Kupferoxydul, das dem Blutzucker + ein Milligramm Zucker der Kupferlösung entspricht, zu oxydieren. Um den Wert für den Blutzucker zu erhalten, muß die Permanganatmenge, die einem Milligramm Zucker entspricht, abgezogen werden. Diese Menge wird mittels des sogenannten „blinden“ Versuches ermittelt, d. h. es wird anstatt 5 ccm des Blutfiltrats die gleiche Menge destillierten Wassers genommen und im übrigen die Bestimmung in oben beschriebener Weise ausgeführt. Selbstverständlich braucht dieser blinde Versuch nicht jedesmal angestellt zu werden, sondern nur einmal zur Kontrolle der Brauchbarkeit der Reagentien. Dieser Versuch ergibt immer dieselbe Zahl, und zwar 2,15 ccm, da 2,0 ccm einem Milligramm Zucker entsprechen und 0,15 ccm der Permanganatlösung zur Endreaktion für 6 ccm Eisensulfatlösung erforderlich sind. Die Berechnung des Zuckergehaltes des Blutes geschieht nun nach einer einfachen Formel: $x = (m - n) \times 0,2$, wo m die Zahl des Hauptversuches und n die Zahl des blinden Versuches bedeutet. Beispiel: es ist im Hauptversuch 2,85 ccm Permanganatlösung verbraucht worden. Der Zuckergehalt des Blutes ist dann $(2,85 - 2,15) \times 0,2 = 0,14\%$.

Die Bestimmung dauert durchschnittlich eine halbe Stunde. Sie ergibt genaue und zuverlässige Resultate. Da die Endreaktion scharf ausgesprochen ist und durch $\frac{1}{20}$ ccm der Permanganatlösung hervorgerufen wird, so kann der Zuckergehalt mit einer Genauigkeit von 0,01% bestimmt werden. Ein Vorteil der Methode besteht darin, daß auch subnormale Zuckermengen (Hypoglykämien) mit derselben Genauigkeit festgestellt werden können.

Ich habe dieselbe Methodik auch für Zuckerbestimmungen im Harn angewandt, besonders in Fällen, wo nur ganz minimale Harnmengen zur Verfügung stehen, nämlich bei funktioneller Nierendiagnostik. Hier gelangen nicht selten nur einige Kubikzentimeter Harn zur Untersuchung; in dieser geringen Menge sollen außer dem Zucker noch Harnstoff und Kochsalz bestimmt werden. Man kann dabei selbstverständlich nur Mikromethoden anwenden. Es läßt sich mit der angegebenen Methode eine genaue

Bestimmung mit 0,1 ccm Harn ausführen. Das Verfahren bleibt im ganzen genau dasselbe: man braucht nur den Harn auf das 100fache zu verdünnen und von dieser Verdünnung 5,0 ccm zur Bestimmung zu verwenden. Bei der Berechnung zieht man von der erhaltenen Permanganatzahl die Zahl des blinden Versuches ab und erhält unmittelbar den Prozentgehalt des Zuckers. Beispiel: Es sind 7,55 ccm Permanganat verbraucht worden. Der Zucker-gehalt beträgt: $7,55 - 2,15 = 5,4\%$. Die Genauigkeit der Methode für den Harn beträgt 0,05%. Kontrolluntersuchungen mit dem Polarisationsapparat ergaben sehr gut übereinstimmende Resultate.

Zusammenfassung: Die angegebene Mikromethode, die aus dem vom Verfasser im Jahre 1913 veröffentlichten Verfahren entstanden ist, ermöglicht eine genaue (bis 0,01 %) Zuckerbestimmung mit 0,35 ccm Blut. Bei der neuen Methodik ist u. a. eine wichtige Fehlerquelle, die durch die Selbstreduktion der alkalischen Seignettesalzlösung bedingt wird, ausgeschaltet. Die Methode kann auch für Zuckerbestimmung im Harn angewandt werden. Sie ist besonders bei der funktionellen Nierendiagnostik am Platze, da hierbei nicht selten nur sehr geringe Harnmengen zur Untersuchung gelangen; schon mit 0,1 ccm Harn läßt sich eine genaue Zuckerbestimmung ausführen.