

Über den Nachweis von Glucuronsäure im menschlichen Blut mit der Orcin- und der Naphthoresorcinprobe.

Von

Ernst Diebschlag,

Approbierter Arzt aus Mülheim a. d. Ruhr.

Die Tatsache, daß bei Untersuchungen über den Blutzuckergehalt keine Übereinstimmung zwischen den Werten der Polarisation und der Reduktionsfähigkeit des untersuchten Blutes festzustellen war, daß vielmehr bei der titrimetrischen Bestimmung des Blutzuckers stets höhere Werte als bei der Polarisation gefunden wurden, mußte zu der Annahme führen, daß im Blute neben dem Traubenzucker noch andere reduzierende Substanzen vorhanden sein müßten. Erwähnenswert sind die genauen quantitativen Bestimmungen von Otto, der feststellte, daß außer der gärungsfähigen Dextrose noch eine gärungsunfähige, reduzierende Substanz im Blute vorkommt. Was das für eine Substanz sei, diese Frage wagt Otto noch nicht zu entscheiden.

Jakobsen kam auf Grund seiner Untersuchungen zu dem Schluß, daß es sich hier um das Jecorin handele, eine Verbindung von Glucose mit Lecithin. Er fand nämlich, daß diese reduzierende Substanz in Äther löslich war, wie das von Drechsel beschriebene Leberjecorin. Lange Zeit wurde diese Annahme Jakobsons von vielen der folgenden Untersucher als feste Tatsache hingenommen. Aber man dachte nicht an die Möglichkeit, daß doch auch noch andere Sustanzen in Frage kommen könnten, die ebenfalls in Äther löslich sind.

Ein anderes Ergebnis brachten die Untersuchungen von Pavý und Siau. Sie schlossen aus dem gefundenen Schmelzpunkt auf Isomaltose, die sie als zweites Kohlenhydrat neben der Glucose ansprachen.

Diese Ergebnisse stellte zuerst P. Mayer in Zweifel. Er stellte die Frage auf, ob es sich nicht an Stelle des Jecorins und der Isomaltose ganz oder teilweise um gepaarte Glucuronsäuren handeln könnte, die einerseits wie das Jecorin in Äther löslich sind, andererseits als Phenylhydrazinverbindung fast den gleichen Schmelzpunkt (159—164°) wie die Isomaltose besitzen. Im Harn war schon seit längerer Zeit Glucuronsäure nachgewiesen, und P. Mayer hatte im Diabetikerharn wiederholt eine gesteigerte Glucuronsäuremenge gefunden. Jetzt fahndete er in Kaninchens- und Rinderblut, in einem Fall auch in Menschenblut, auf Glucuronsäure. Er wandte zunächst die Phloroglucin- und die Orcinprobe an und schloß aus ihrem positiven Ausfall, daß es sich nur

um Pentosen oder Glucuronsäure handeln könne. Bei der Polarisation fand er in allen Fällen eine Linksdrehung, die beim Erhitzen mit konz. H_2SO_4 verschwand, in einem Falle sogar in eine schwache Rechtsdrehung überging. Auch dieser Befund deutete auf Glucuronsäure. Völlig gesichert wurde die Annahme, daß Glucuronsäure im Blut vorhanden sei, als er dieselbe aus einem größeren Quantum Rinderblut als p.-Brom-phenylhydrazinverbindung darstellen konnte.

Später bestätigten Lépine und Boulud diesen Befund. Sie wiesen die Glucuronsäure besonders in den geformten Elementen des Blutes nach.

Seitdem findet merkwürdigerweise lange Zeit in der Literatur keine Angaben mehr über den Nachweis von Glucuronsäure im Blute. Erst im vorigen Jahr deutet Stepp bei Gelegenheit seiner Arbeiten über den Rest-Kohlenstoff im Blute wieder darauf hin, daß unter den reduzierenden Substanzen, die sich nach Vergärung des Blutzuckers noch im Blut finden, die Glucuronsäure sicherlich eine große Rolle spielen dürfte. Er unternahm dann auch anschließend Versuche, die Glucuronsäure direkt im menschlichen Blute, und zwar von Gesunden, Nephritikern und Diabetikern nachzuweisen und bediente sich dazu der Phloroglucin-, Orcin- und der von B. Tollens angegebenen Naphthoresorcinprobe. Seine Ergebnisse legte er in einer vorläufigen Mitteilung in Hoppe - Seylers Zeitschrift für physiol. Chemie nieder.

Als Material benutzte Stepp geringe Mengen (0,3—0,5 ccm) enteiweißten Blutes, das vorher zum Zwecke der Vergärung und Polarisation auf $\frac{1}{6}$ — $\frac{1}{10}$ seines Ursprungsvolumens eingeengt worden war. Während die Phloroglucinprobe gleich positiv ausfiel, ergab die Orcinprobe zunächst nur eine leichte Gelbfärbung. Erst als er nach der Vorschrift von Bial, um die Spaltungsbedingungen der gepaarten Glucuronsäuren zu verbessern, etwas Eisenchloridlösung zufügte, fiel auch die Orcinprobe nach 1 Minute Kochen schön positiv aus: „prachtvolle Grünfärbung der Flüssigkeit, der der Farbstoff mit Amylalkohol mit Leichtigkeit entzogen werden konnte.“

Die Naphthoresorcinprobe nach B. Tollens stellte Stepp entsprechend den geringen Mengen des zum Versuch genommenen Blutextraktes folgendermaßen an: „0,3—0,5 Blutfiltrat wurden mit einigen winzigen Körnchen Naphthoresorcin versetzt, die gleiche Menge rauchende oder 25 proz. Salzsäure zugefügt, gekocht und etwa $\frac{1}{2}$ Minute im Kochen gehalten. Dann wurde unter fließendem Wasser gekühlt, das Reaktionsgemisch mit Äther versetzt und der gebildete Farbstoff ausgeschüttelt.“ Das Abmessen der einzelnen Mengen geschah mit genau geteilten Pipetten.

Alle untersuchten Blutproben von Gesunden, Nephritikern und Diabetikern ergaben eine deutliche positive Re-

aktion. Der Ätherauszug zeigte prachtvolle blauviolette Färbung, während die darunter befindliche Flüssigkeit grün fluorescierte.

Von großem Interesse war es, daß der Ausfall der Reaktionen bei Nephritikern im Stadium der Azotämie am stärksten, bei Gesunden stets deutlich war, hingegen bei den Diabetikern wechselnd ausfiel. Der schwächere Ausfall der Naphthoresorcinreaktion bei einigen Diabetikern erscheint Stepp besonders wichtig im Hinblick auf das Ergebnis seiner Restkohlenstoffuntersuchungen. Er fand nämlich, daß bei einer großen Zahl von Diabetikern die Werte des Restkohlenstoffs niedriger sind, als man nach dem vermehrten Blutzucker erwarten konnte.

Diese vorläufigen Mitteilungen Stepps bedurften aber noch einer genaueren Prüfung, und in seinem Auftrage unterzog ich mich dieser Aufgabe.

Da mit den geringen zur Verfügung stehenden Blutfiltratmengen keine quantitativen Bestimmungen¹⁾ gemacht werden konnten, so kam es darauf an, die Versuchsbedingungen für die Farbreaktionen so zu gestalten, daß man die einzelnen Proben in ihrem Ausfall miteinander vergleichen und so mit einiger Gewißheit auf ihren stärkeren oder schwächeren Gehalt an Glucuronsäure schließen konnte. Es galt zunächst, zur gleichen Menge Filtrat stets gleiche Mengen der Reagentien zuzufügen. Sodann war zu beachten, daß die eingeengten Filtrate, die zur Untersuchung kamen, nicht überall den gleichen Mengen des ursprünglichen Blutes oder Serums entsprachen. Es war nämlich einmal mehr, einmal weniger Blut zur Verarbeitung gelangt, dann war durch die Enteiweißung mit Phosphorwolframsäure und die weitere Verarbeitung (Entfernung der Phosphorwolframsäure mit Bleiacetat, Entfernung des Bleies usw.²⁾) eine Verschiebung der Volumina eingetreten, die nicht in allen Fällen die gleiche war. Es mußte nun in jedem einzelnen Fall ausgerechnet werden, einer wie großen Menge des ursprünglichen Gesamtblutes oder Serums die zur Probe verwandte Menge jedesmal entsprach. Folgende Faktoren waren in Rechnung zu stellen:

1. Die ursprüngliche Menge des verwandten Gesamtblutes resp. Serums [Vol.]

2. Das abgelesene Gesamtvolume nach Zusatz der zur Verdünnung verwandten Wassermenge und des Fällungsmittels zu der Ausgangsblutmenge [V(ges.)].

3. Das Volume des zur weiteren Verarbeitung genommenen aliquoten Teils des Filtrats nach der P.-W.-S.-Fällung [V₁].

¹⁾ Z. B. die Furfurol-Salzsäuredestillationsmethode, wie sie C. Tollens für die quantitative Glucuronsäurebestimmung im Urin angibt.

²⁾ Im folgenden bedeutet der Ausdruck „Filtrat“ stets das nach der Einengung gewonnene Extrakt.

³⁾ Genaueres siehe bei Stepp, Hoppe-Seyler Zeitschr. f. ph. Ch. 107, 29. 1919.

4. Das Volumen nach Zusatz von Bleiacetat [V₂].
 5. Das zur Einengung gelangende Volumen nach dem Abfiltrieren des Schwefelbleis [V₃].
 6. Das nach der Einengung gewonnene Extrakt [V₄].
 7. Die zur Probe verwandte Menge des Extraktes [V(end)].
- Diese Faktoren wurden in folgende Formel gebracht:

$$x = \frac{Vol}{V(\text{ges})} \cdot \frac{V_1 \cdot V_3}{V_2} \cdot \frac{V(\text{end})}{V_4}$$

x bedeutet darin die Menge des Ausgangsmaterials, die in der zu den Farbenreaktionen verwandten Menge Filtrats enthalten ist. Zu den Reaktionen nahm ich in den ersten beiden Versuchen 0,3, später stets 0,5 ccm.

Als Untersuchungsmaterial standen mir 33 Filtrate zur Verfügung, die zum Teil frisch gewonnen, zum Teil aber schon älteren Datums waren, das älteste Filtrat stammte vom März 1919. Die Filtrate rührten her in 25 Fällen von Gesamtblut, in 6 Fällen von Blutserum, in 2 Fällen von dem Pleuraexsudat einer Diabetikerin. Von den Fällen waren 3 gesund, resp. unwesentlich erkrankt, 13 Nierenkranke, eine Eklampsie, ein Verdacht auf Diabetes, 13 Diabetiker, 1 Polycythaemia rubra, 1 Filtrat stammte von Ochsenblut. In den meisten Fällen war die Phosphorwolframsäurefällung angewandt worden, in 3 Fällen jedoch die Eisenfällung nach Rona, in einem anderen Falle die Fällung mit Quecksilber nach Schenk. Die Umrechnung auf die zur Probe kommenden Ausgangsblutmengen mußten hier entsprechend modifiziert werden, gestaltete sich aber einfacher wie die Rechnung bei der P.-W.-S.-Fällung.

Die bei den Berechnungen erhaltenen Zahlen werden auf der weiter unten folgenden Tabelle jedesmal angeführt.

Wie oben erwähnt, wurden nun mit all diesen Filtraten die Orcin- und die Naphthoresorcinprobe angestellt. Die Orcinprobe ist außer für Glucuronsäure auch für Pentosen positiv. Um letztere auszuschließen wurde die Naphthoresorcinprobe angestellt, die Pentosen nicht anzeigt. Von der Phloroglucinprobe wurde Abstand genommen, da sie im wesentlichen die gleichen Resultate ergibt wie die Orcinprobe, und die geringen Reste der Filtrate, die zum größten Teil schon zu andern Zwecken verbraucht waren, Sparsamkeit erforderten.

In den beiden ersten Versuchen (Ko., Diabetes, und Me., Nephritis), in denen ich, wie erwähnt, 0,3 ccm Filtrat benutzt hatte, stellte ich die Orcinreaktion folgendermaßen an: Ich hielt mich genau an die von Bial angegebenen Mengen, nur daß ich sie entsprechend dem 10fach geringeren Quantum der zur Untersuchung genommenen Flüssigkeit herabsetzte, also zu 0,3 Filtrat 0,5 konzentrierte Salzsäure, eine ganz geringe Messerspitze Orcin in Substanz und 1 Tropfen einer 10fach

verdünnten Eisenchloridlösung. Nach 1 Minute Kochen zog ich den Farbstoff mit 2 ccm Amylalkohol heraus, der dann bei positiver Reaktion eine wunderschöne klare, schwärzlichgrüne Färbung aufwies. Nach kurzem Stehen ging jedoch diese Grünfärbung regelmäßig in ein klares Braun über.

Die Naphthoresorcinreaktion stellte sich in diesen beiden Versuchen nach der Weise an, wie sie Stépp angibt: 0,3 ccm Filtrat, eine winzige Menge Naphthoresorcin in Substanz, 0,3 rauchende Salzsäure, $\frac{1}{2}$ Minute kochen, unter fließendem Wasser abkühlen und mit 2 ccm Äther gründlich ausschütteln. Der Äther nahm dann bei positivem Ausfall die prachtvolle blaulila Farbe an.

Alle folgenden Versuche machte ich mit 0,5 ccm Filtrat. Dementsprechend verwandte ich nun zur Orcinprobe etwas mehr Orcin, 0,85 ccm konzentrierte Salzsäure und 2 Tropfen der 10fach verdünnten Eisenchloridlösung. Im übrigen verfuhr ich in derselben Weise wie vorher.

Die Naphthoresorcinprobe stellte ich jedoch von nun an in wesentlich anderer Weise an. Da der Zusatz von Naphthoresorcin in Substanz kein genaues Maß darstellte, ich auch befürchtete, durch nur $\frac{1}{2}$ minütliches Kochen nicht alle gebundene Glucuronsäure zur Spaltung bringen zu können, gab ich lieber einem Verfahren den Vorzug, wie es C. Tolleens für den Nachweis der Glucuronsäure im Harn angibt (vgl. Hoppe - Seyler, Zeitschr. f. physiol. Chemie 64, 40). Er nahm auf 5 ccm Urin 5 ccm konzentrierte Salzsäure und 0,5 ccm einer 1 proz. alkoholischen Naphthoresorcinlösung, kochte 15 Minuten im Wasserbad und schüttelte nach gutem Abkühlen mit Äther aus. Entsprechend der 10 mal kleineren von mir verwandten Menge nahm ich auch nur 0,5 ccm konzentrierte Salzsäure und 0,05 ccm einer 1 proz. alkoholischen Naphthoresorcinlösung. Während des 15 Minuten langen Kochens trat zunächst eine grüne Fluorescenz in der gelblich gefärbten Flüssigkeit auf, die je nach der Stärke der Reaktion bald in eine mehr grünlich-schwarze oder rötlichgrüne schmutzige Farbe überging. Ich kühlte dann unter fließendem Wasser gründlich ab und schüttelte den gebildeten Farbstoff mit 2 ccm Äther energisch aus. In einzelnen Fällen, die einer größeren Ausgangsmenge Blut oder Serum entsprachen, nahm ich auch mehr Äther. In den meisten Fällen erhielt ich nun schöne Violettfärbung, die in den einzelnen Fällen Unterschiede in der Intensität und Nuance von Blaulila bis zum Rotviolett zeigte. Die darunterstehende Flüssigkeit zeigte stets eine prächtige Grünfärbung, die zwischen hellstem Grün bis zum undurchsichtigen Schwarzgrün wechselte und schöne grüne Fluorescenz aufwies. Nach einiger Zeit verschwand gewöhnlich aus beiden Schichten die Blaukomponente, so daß die Ätherschicht einen immer röteren Ton annahm und die darunter befindliche Schicht gelb wurde, ohne aber ihre grüne Fluorescenz zu

Nr.	Fall	Dat.	Art der untersuchten Flüssigkeit	Wieviel derselb. in 0,5 enthalt.	Orcinprobe	Naphthoresorcinprobe	Reduktionswert in % nach	
							Bert.	Maqu.
1	Ko. Diabetes	14. 11.	Ges. Blut	0,428	schöne klare Grünfärbung	schwache Violett-färbung	0,230	0,207
2	Me. Neph. I	24. 7.	" "	1,445	kräft. Grün	kräft. Violett	0,244	0,241
3	Me. " II	19. 6.	" "	1,787	schönes tief. Grün	schönes tief. Lila	0,213	0,211
4	Me. " III	1. 7.	" "	1,595	schönes tief. Grün	etwas heller wie 3	0,1685	—
5	Ke. Urämie	7. 11.	Serum	2,261	bräunl. Grün	schönes kräftiges Violett	0,205	0,208
6	Bü. Diabet. I	11. 7.	Ges. Blut	2,722	schönes sattes Grün	bräunlichviolett. Schimmer	0,408	0,4114
7	Bü. " II	18. 8.	" "	2,533	prächtiges sattes Grün	bräunlichviolett. Schimmer	0,368	0,3638
8	Sche. Nieren-sklerose I	20. 11.	Serum (Rona)	1,56	prächtiges dunkl. Grün	wundersch. Lila	0,151	—
9	Sche. Nieren-sklerose II	20. 11.	Ges. Blut	2,769	prächtiges dunkl. Grün	schönes Violett	0,109	0,114
10	Med. Urämie	26. 5.	Serum	1,728	bräunlich grüne Farbe	prächtig kl. Lila	0,9691	0,9344
11	Te. Normal	9. 12.	Ges. Blut	1,760	schön schwärzl. Grün, etwas hell. als 6 u. 8	prächtiges Lila	0,0905	—
12	Ga. Nierenskl.	11. 8.	" "	1,665	wie 11	wie 11	0,1735	0,1721
13	Fei. Nephrit.	2. 12.	" "	2,426	wie 12, etwas heller	lila, heller wie bei 11 und 12	0,116	—
14	Pe. Diabet. I	15. 5.	" "	1,514	schönes Grün, et-was bräunlich	schönes Lila	0,269	0,272
15	Pe. " II	23. 6.	" "	1,339	schönes Grün, et-was bräunlich	schönes Lila	0,327	0,3255
16	La Koma Diabetes I (Schenk)	18. 11.	" "	1,666	Ganzprachtvolles satt. Tiefgrün	blasses Lila	0,483	0,486
17	La Koma Diabetes II (P. W. S.)	Ges. Blut		1,110	etwas heller wie 16	blasses Lila		
18	Scho. Diabet.	31. 7.	Ges. Blut	2,304	schönes Grün, dunkl. wie 17	etwas dunkler wie 17	0,3523	0,357
19	Rü. Diab. I	9. 7.	Exsud. (Rona)	1,281	helles Grün	wundervolles Lila	0,244	0,239
20	Rü. Diab. II	5. 8.	Exsud. (P. W. S.)	4,308	in 4 ccm Amyl-alk. bräunl. gr. gleich hell wie 19	in 4 ccm Äther hellbräunl. mit viol. Schimmer	0,2542	0,256
21	Mü. Ludw. Diab.	31. 10.	Ges. Blut	2,291	prächt. dunkl. Grün	schönes Lila	0,203	0,2028
22	Mü. Hermann Diab.	9. 7.	" "	4,440	in 4 ccm A. A. etw. hell. gr. wie 21	in 4 ccm Äther hellröt. viol.	0,347	0,341
23	Heu. norm.	22. 5.	" "	0,899	helles braungrün	schönes rein. Lila	0,1065	—
24	Scher. norm.	15. 7.	" "	2,398	kräft. bläul. Grün	kräft. Rotbraun m. bl. Schimm.	0,134	0,137
25	Bä. Nierenskl.	12. 8.	" "	2,329	braungrün	schön rotviolett	0,1545	0,1538
26	Si. Nephri.	3. 5.	" "	3,634	in 4 ccm A. A. hell. Grünbraun	in 3 ccm Äther hell. viol. braun	0,167	0,157

Nr.	Fall	Dat.	Art der untersuchten Flüssigkeit	Wieviel derselb. in 0,5 enthält.	Orcinprobe	Naphth. res. probe	Reduktionswert in % nach	
							Bert.	Mag.
27	Go. Polyc. rubr.	24. 3.	Serum	4,401	in 4 ccm A. A. ganz schwach braungrün	In 4 ccm Äther schön. kl. Lila	0,093	—
28	Schl. Verd. auf Diabetes	17. 12.	Ges. Blut	1,171	Schönes braungrün	kräftiges Lila	0,103	—
29	Se. Diabetes	3. 1.	„ „	1,262	Mittelstark. reines Grün	Rotbraun m. ger. viol. Ton	0,279	0,2782
30	De. Eklampsie	7. 1.	Serum	1,76	Schönes klares Grün	schönes klares Violett	0,9707	0,0992
31	Ho. Neph. r.	8. 1.	Ges. Blut	1,86	Schönes klares Grün	viol. etwas tiefer wie 30	0,0378	0,0372
32	Er. „	9. 1.	Serum (Rona)	2,102	prächtiges blau-grün	mittelkräftiges Violett	0,6267	0,6414
33	Rinderblut	22. 1.	Ges. Blut	4,259	in 4 ccm A. A. tiefes schönes Dunkelgrün	In 4 ccm Äther schönes klares Lila	0,378	—

verlieren. Ich stellte immer eine Reihe von Untersuchungen gleichzeitig an, so daß ich den Ausfall der einzelnen Reaktionen miteinander vergleichen konnte. Die anfängliche geringe Trübung der Ätherschicht, hervorgerufen durch Beimengung feinsten Tröpfchen des Filtrats, verschwand stets nach kurzer Zeit, so daß die Ätherschicht schön klar wurde und die Farbreaktion nicht mehr durch diese Beimengung beeinflußt werden konnte.

Ferner wurde darauf geachtet, Reagensgläschchen von möglichst gleichem Durchmesser zu benutzen, so daß die Farblösungen in gleicher Dicke zur Anschauung kamen.

In der beigefügten Tabelle sind die 33 von mir untersuchten Fälle mit dem Ausfall ihrer Orcin- und Naphthoresorcinproben zusammengestellt. In der 4. Spalte ist angegeben, welcher Art die Ausgangsflüssigkeit war, die zur Entweißung genommen wurde, ob Gesamtblut, Serum oder Exsudat. Die 5. Spalte enthält die durch Rechnung erhaltenen Mengen Ausgangsmaterial, die in den zu den Farbreaktionen genommenen Mengen Filtrat enthalten war. Die beiden letzten Spalten enthalten die Mengen reduzierende Substanzen in den einzelnen Blutproben in Prozenten, zuerst nach dem Verfahren von Bertrand, dann nach dem von Maquenne. Herr Prof. Stepp hatte die Freundlichkeit, mir diese Zahlen zur Verfügung zu stellen.

Die Tabelle zeigt nun manches Bemerkenswerte.

Alle Reaktionen sind als positiv zu bezeichnen. Jedoch zeigen sich in der Stärke des Ausfalls wesentliche Unterschiede. Diese sind zum Teil darauf zurückzuführen, daß in den benutzten Mengen Filtrat

(0,5 resp. 0,3 ccm) ganz wesentlich verschiedene Mengen Ausgangsmaterial zum Ausdruck kommen. Dem wurde dadurch Rechnung getragen, daß bei sehr großen Mengen Ursprungsmaterial Amylalkohol und Äther in entsprechend vermehrter Menge genommen wurde. Aber auch, wenn man diese wechselnden Mengenverhältnisse des Ursprungsmaterials in Betracht zieht, bleiben doch noch auffallende Unterschiede in der Stärke der einzelnen Reaktionen.

Während nämlich bei den Gesunden und den Nierenkranken, die meist Stickstoffretention zeigten, in der Mehrzahl der Fälle gute Naphthoresorcinreaktionen erzielt wurden, fiel bei einem großen Teil der Diabetiker dieselbe deutlich schwächer aus. So zeigte Fall 1 (Ko) nur eine schwache Violettfärbung; Fall 6 und 7 (Bü., dem an 2 verschiedenen Tagen Blut entnommen war) zeigte vor allem sehr zweifelhafte Reaktion. Der Äther färbte sich braun und wies nur einen undeutlich violetten Schimmer auf: Fall 16 und 17 La., Koma) zeigte beidesmal ein nur zartes blasses Lila (beide Proben stammen von derselben Blutentnahme). Auch der nächste Fall 18 (Scho.) zeigt zwar eine etwas dunklere Tönung des Lila wie Fall 16 und 17, jedoch war hier auch die Ursprungsmenge fast doppelt so groß, und das Lila war noch nicht so stark wie in der Mehrzahl der Nichtdiabetiker. Fall 22 (Mü. Herm.) zeigte ebenfalls hellere Reaktion, die außerdem mehr zum Rot hinübergreichte. Schließlich zeigte noch Fall 29 (Se.) eine nicht so einwandfreie Reaktion, indem der Farbton wenig des typisch Violetten an sich hatte. Hierin stimmen diese Ergebnisse ganz mit denen überein, die Stepp in seiner vorläufigen Mitteilung berichtet, daß nämlich die Naphthoresorcinprobe beim Diabetiker vielfach schwächere Ausfälle gäbe. Die Angabe Stepps, daß das Blut von Nephritikern im Stadium der Acotämie besonders starke Reaktion gebe, wurde jedoch von mir nicht bestätigt.

Interessant sind auch die Ergebnisse in Fall 19 und 20. Diese Diabetikerin wurde 2 mal einer Pleurapunktion unterworfen, zuerst am 9. VII., dann am 5. VIII. 19; während nun das erste Punktat eine prächtige positive Naphthoresorcinprobe und ebenfalls eine positive Orcinprobe aufwies, war im 2. Fall die Reaktion mit Naphthoresorcin fast negativ und auch die Orcinprobe zeigte nicht den klaren grünen Ton. Auffallend sind nun diese beiden Befunde erst im Zusammenhang mit anderen Ergebnissen, die Stepp hier feststellte. Beide Exsudate zeigten mit den Reduktionsmethoden nach Bertrand und Maquenne keine wesentlichen Unterschiede in den Werten ihrer reduzierenden Substanzen. Dagegen wurde im ersten Fall, der auch die starke Naphthoresorcinprobe zeigte, ein bedeutender Unterschied zwischen dem Polarisationswert und dem Reduktionswert gefunden, im zweiten Fall ein viel geringerer. Folgende Tabelle möge die Unterschiede in den gefundenen Zahlen verdeutlichen.

	Orcin	Naphthoresorcin	Reduktion		Polarisation
			Bertr.	Maqu.	
Rü. 9. 7.	hellgrün	wundervolles Lila	0,244	0,239	0,10976
Rü. 5. 8.	braungrün	hellbräunl. m. viol. Schimm.	0,2542	0,256	0,2275

Man kann daran denken, daß unter den vermehrten, unbekannten Stoffen, die im 1. Fall den großen Unterschied zwischen Reduktion und Polarisation ausmachen, die Glucuronsäure einen erheblichen Anteil nimmt.

Nun ist aber die Frage aufzuwerfen, ob diese abgeschwächte Naphthoresorcinreaktion bei den Diabetikern wirklich auf einen verminder-ten Glucuronsäuregehalt des Diabetikerblutes zurückzuführen ist oder ob nicht auch andere Faktoren hier eine mitbestimmende Rolle spielen. Vor allem ist schon verdächtig, daß in all diesen Fällen abgeschwächter Naphthoresorcinreaktion die Orcinprobe schön positiv ausgefallen ist. Man könnte vielleicht daran denken, daß Pentosen vorhanden waren, die die positive Orcinreaktion gaben, während sie ja die Naphthoresorcinprobe nicht oder sogar hemmend beeinflußten.

Da nun auch wegen des allzu großen Unterschiedes der Mengen Ausgangsmaterial, die in je 0,5 ccm Filtrat vorhanden waren, die vorgenommene Untersuchungsmethode doch zu ungenaue Aufschlüsse bot, wurde nun mit einer Anzahl von Fällen, die dazu geeignet waren, und von denen noch ausreichende Mengen Filtrat mir zur Verfügung standen, eine andere Art der Untersuchung angestellt. Es galt, stets die gleichen Mengen des ursprünglichen Materials zum Vergleich zu bekommen, ferner diese Mengen abzustufen und immer weiter zu verdünnen, um den Schwellenwert, d. h. die kleinste Menge Blut festzustellen, die eben noch einen positiven Ausschlag der Naphthoresorcinprobe ergab. Ich folgte C. Tollens, der bei der Naphthoresorcinprobe für den Harn vorschlägt, entweder die zugefügte Äthermenge zu vermehren oder mit der Harnmenge herunterzugehen. Letztere Methode hält er für die bessere.

Wie war es nun anzustellen, daß einerseits stets gleiche Blutmengen zur Reaktion kamen, andererseits die zur Probe genommene Flüssigkeitsmenge stets die gleiche (0,5 ccm) blieb? Letzteres war nötig, um die gleichen Versuchsbedingungen zu behalten. Ich ging nun so vor, daß ich Stammlösungen herstellte, von denen gleiche Mengen auch die gleichen Mengen ursprünglichen Blutes enthielten. Diese Stammlösungen konnte ich nun beliebig abstufen und die einzelnen Abstufungen der verschiedenen Fälle enthielten nun stets die gleichen Vergleichsmengen Blut oder Serum. Da, um mit den kleinen noch vorhandenen Mengen der eingeengten Filtrate möglichst genaue Resultate zu erhalten, sehr kleine Quanta abzumessen waren — bis in die 3. Dezimalstelle —, und mit den vorhandenen Pipetten 0,05 ccm das kleinste Maß war, das

noch bequem und mit genügender Sicherheit zu gebrauchen war, so war es nötig, noch besondere Hilfslösungen herzustellen

Ein Beispiel möge vorstehendes erläutern:

Bei Fall 22 (Mü. Hermann, Diabetes) war durch Rechnung, wie oben angeführt, festgestellt, daß 0,5 ccm des eingeengten Filtrats 4,440 ccm des frischen Blutes vor der Bearbeitung entsprach. Also entsprach

$$1,0 \text{ ccm Blut} \frac{0,5 \cdot 1,0}{4,440} = 0,1126, \text{ rund } 0,113 \text{ ccm Filtrat. Diese } 0,113 \text{ ccm}$$

Filtrat waren nun abzumessen und zu einer bestimmten Menge mit Aqua dest. aufzufüllen. 0,11 ccm war mit der Pipette gut abzumessen. Fehlte noch 0,003 ccm. Um diese zu bekommen, nahm ich 0,05 Filtrat und füllte mit Aqua dest. auf 1,0 auf. Diese 1,0 ccm Lösung enthielten also 0,05 ccm Filtrat, 0,02 derselben also 0,001 Filtrat und 0,06 derselben, 0,003 ccm Filtrat. Ich fügte also zu den schon abgemessenen 0,11 Filtrat noch diese 0,06 der Hilfslösung, füllte mit Aqua dest. auf 5,0 auf und hatte so eine Stammlösung, in deren 5 ccm 0,113 Filtrat gleich 1,0 ursprüngliches Blut enthalten war. Von dieser so hergestellten Stammlösung nahm ich nun 0,5, 0,25 und 0,05 ccm entsprechend 0,1, 0,05 und 0,01 Blut. füllte die beiden letzten Quanta auf 0,5 ccm auf und stellte hiermit die Naphthoresorcinprobe wie früher an. Außerdem stellte ich durch weitere Verdünnung noch 0,005 ccm Blut dar.

In gleicher Weise verfuhr ich noch mit weiteren 5 Fällen, und zwar mit Fall 2 (Me., Nephritis), Fall 11 (Te., normal), Fall 16 (La., Koma), Fall 29 (Se., Diabetes) und Fall 31 (Ho., Nephritis).

Vorsichtshalber wurden noch mehrere Kontrollversuche nur mit Aqua dest. angefügt. Diese ergaben stets eine Spur rötlich violetter Tönung; auf diese Eigenreaktion mußte bei der Bewertung der übrigen Reaktionen Rücksicht genommen werden. Diese hatten nun folgendes Ergebnis.

Die stärksten Reaktionen waren bei Te. (normal), Me. (Nephritis) und La. (Koma). Hier zeigte 0,005 Blut noch einen wenn auch schwachen aber noch sicher wahrnehmbaren Ausschlag gegenüber den Kontrollversuchen, bei Me. war jedoch die Blaukomponente in allen Stufen etwas ausgeprägter.

Etwas schwächer fiel die Reaktion bei Mü. Herm. (Diabetes) aus, hier war die Reaktion in 0,005 Blut von dem Kontrollversuch nicht mehr zu unterscheiden, erst 0,01 zeigte deutlich stärkere Violettfärbung.

Noch etwas schwächer war die Reaktion bei Se. (Diabetes) und Ho. (Nephritis). Hier war auch noch die Reaktion mit 0,01 nicht mit Sicherheit vom Kontrollversuch zu unterscheiden, und erst die Probe mit 0,05 konnte als positiv bezeichnet werden.

Diese abgestuften Untersuchungen haben 2 überraschende Ergebnisse. Zunächst zeigen sie, mit welch geringen Mengen die Naphtho-

resorcinprobe noch einen deutlich positiven Ausschlag zu geben vermag. Besonders überraschend ist aber die starke Reaktion bei den Diabetikern, vor allem bei dem Koma — aber auch die beiden anderen Diabetiker zeigten stärkeren Ausschlag, wie nach dem ersten Versuch zu erwarten stand. Dies in Verbindung mit der früheren Orcinprobe, die wie erwähnt, schön positiv ausgefallen war, mußte die Bedenken bestärken, ob nicht doch noch andere Komponenten als die Glucuronsäure hier eine Rolle spielten. Oben wurde schon die Anwesenheit von Pentosen in Betracht gezogen. Aber diese erklären noch nicht den verschiedenen Ausschlag der Naphthoresorcinreaktionen.

Vielelleicht lag aber eine stärkere Eigenreaktion der Reagentien vor, die in diesen stark verdünnten Lösungen erst zum sichtbaren Ausdruck kam? Nun führt Neuberg an, daß Naphthoresorcin in alkoholischer Lösung schon positive Reaktionen zu geben vermag, wenn dieselbe eine Zeitlang dem Licht ausgesetzt gewesen war. Es bilden sich dann höchstwahrscheinlich kleine Mengen Glyoxalsäure, die auch positive Reaktion mit Naphthoresorcin gibt. Um dies zu prüfen, wurden 2 Kontrollproben mit Aqua dest. angestellt, und der einen 0,05 ccm der 1 proz. alkoholischen Lösung, der anderen etwa 1 Milligramm Naphthoresorcin in Substanz zugefügt. Es zeigte sich, daß die Probe mit Naphthoresorcin in Substanz deutlich schwächer ausfiel. Aber dieser Befund genügt noch nicht zur Erklärung. Waren doch auch vorher Kontrollversuche mit Aqua dest. angesetzt worden und die Blutverdünnungen hatten entschieden stärkere Reaktion gezeigt.

Nun aber berichtet Neuberg auch, daß verschiedene Kohlenhydrate, wie besonders Fruchtzucker, Saccharose und Pentosen, imstande sind, einen Teil des Naphthoresorcin zu fesseln, ohne mit ihm die typische Reaktion zu geben. Auf diese Weise komme eine schwächere Reaktion zustande, wie der anwesenden Glucuronsäure entspräche. Er rät daher in solchen zweifelhaften Fällen Naphthoresorcin im Überschuß zuzusetzen.

Um das für unseren Fall zu prüfen, wurde folgende Probe angestellt: Zunächst wurden mit Fall La. (Koma) 2 Proben nebeneinander ange stellt, die eine mit 0,05, die andere mit 0,1 ccm der 1 proz. alkoholischen Naphthoresorcinlösung. Letztere gab einen bedeutend stärkeren Ausschlag.

Sodann wurde einem anderen Fall mit niedrigem Blutzuckergehalt so viel Dextrose in Substanz zugefügt, daß er dem Blutzuckergehalt von La. entsprach. Die jetzt angestellte Naphthoresorcinreaktion ergab einen erheblich schwächeren Ausschlag als früher.

Nun ist es erklärlich, weshalb diese Diabetesfälle in den ersten größeren Versuchen einen schwächeren Ausfall gaben als in den abgestuften Reaktionen. Denn da zu den unverdünnten Proben der Filtrate die-

selben Mengen (0,05 ccm) Naphthoresorcin zugesetzt worden waren, wie später zu den stark verdünnten, so stand in den letzteren viel mehr Naphthoresorcin für die Glucuronsäure zur Verfügung und konnte mit dieser die typische Reaktion geben.

Man muß wohl aus den Ergebnissen dieser Untersuchungen schließen, daß der schwächere Ausfall der Naphthoresoreinprobe im Blut verschiedener Diabetiker nicht mit Sicherheit eine Verminderung des Glucuronsäuregehaltes anzeigt, denn mit der Erhöhung des Blutzuckers beim Zuckerkranken steigt neben der Glucose auch die Größe einer unfaßbaren Komponente, die störend auf den Ausfall der Naphthoresorcinreaktion zu wirken vermag. Zu dieser unbekannten Komponente gehören aber außer den reaktionshemmenden Stoffen auch solche, die ebenfalls eine positive Reaktion mit Naphthoresorcin zu geben vermögen, wenn auch hier nach C. Tolle ns die Farbennüance der Ätherschicht deutliche Unterschiede gegenüber der reinen Glucuronsäurereaktion aufweist.

So ist diese Farbenreaktion mit Naphthoresorcin also doch zu unsicher, um sie zur Abschätzung der Mengen gepaarter Glucuronsäuren im Blute benutzen zu können. Andererseits zeigen aber die Untersuchungen mit den so stark verdünnten Blutmengen, daß die Naphthoresorcinprobe in Verbindung mit der Orcinprobe und Phloroglucinprobe für den qualitativen Nachweis der Glucuronsäure im Blute ein sehr empfindliches Reagens darstellt.

Zum Schluße ist es mir eine angenehme Pflicht, Herrn Geheimrat Professor Dr. Voit für die Übernahme des Referats, sowie Herrn Professor Dr. Stepp für die Überlassung dieser Arbeit und für die liebenswürdige Hilfsbereitschaft, mit der er mir zur Seite stand, meinen herzlichsten Dank auszusprechen.

Literaturverzeichnis.

- Bial, M., Über den Befund von gepaarter Glucuronsäure in den normalen Faeces. Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. **2**, 518. 1902. — Mayer, Paul, Über eine bisher unbekannte reduzierende Substanz des Blutes. Hoppe-Seylers Zeitschr. ph. Ch. **32**, 518. 1901. — Mandel und Neuberg, Naphthoresorcin als Reagens auf einige Aldehyd- und Ketosäuren. Biochem. Zeitschr. **13**, 148. 1908. — Neuberg, Der Harn. **1**, 436. Springer, Berlin 1911. — v. Noorden, C., Handbuch d. Pathol. des Stoffwechsels **2**, 1907. — Stepp, W., Beiträge zur Kenntnis der reduzierenden Substanzen des Blutes. Hoppe-Seylers Zeitschr. ph. Ch. **107**, 29. 1919. — Stepp, W., Über das Vorkommen von Glucuronsäuren im menschlichen Blut. Vorläufige Mitteilung Hoppe-Seylers Zeitschr. ph. Ch. **107**, 264. 1919. — Tollens, C., Quantitative Bestimmung der Glucuronsäure im Urin mit der Furfurol-Salzsäure-Destillationsmethode. Hoppe-Seylers Zeitschr. ph. Ch. **61**, 95. 1909. — Tollens, C., Über die Menge der im normalen und path. menschl. Urin ausgeschiedenen Glucuronsäure. Hoppe-Seylers Zeitschr. ph. Ch. **64**, 39. 1910. — Tollens, C., Über den Glucuronsäurenachweis durch die B. Tollensche Reaktion mit Naphthoresorcin und Salzsäure. Münch. med. Wochenschr. 1919, Nr. 13.