

Z. klin. Chem. u. klin. Biochem.
7. Jg., S. 14—17, Januar 1969

Die Blutzuckerbestimmung mit der *o*-Toluidin-Methode ohne Eisessig

Von A. HÄRTEL, R. HELGER und H. LANG

Aus der Biochemischen Abteilung der E. Merck AG, Darmstadt

(Eingegangen am 6. August 1968)

Bei der Blutzuckerbestimmung mit *o*-Toluidin bietet die Verwendung eines Gemisches aus Glycolsäure und Äthylenglycolmonomethyläther anstelle von Eisessig folgende Vorteile: keine Geruchsbelästigung, höhere Farbausbeute. Die nach der neuen Variante erhaltenen Glucosewerte stimmen sehr gut mit denen der bisherigen Methode überein, so daß die Anwendung des eisessigfreien *o*-Toluidin-Reagenzes zur Blutzuckerbestimmung im Kliniklaboratorium empfohlen werden kann.

The determination of blood sugar by the o-toluidine method without glacial acetic acid

In the determination of blood sugar with *o*-toluidine, a mixture of glycollic acid and ethyleneglycol-monomethyl ether has the following advantages as a replacement for the glacial acetic acid: no irritant vapour, higher colour yield. The glucose values obtained with the modified method are in good agreement with those obtained by the former method. The use of the new *o*-toluidine reagent without glacial acetic acid is recommended for the determination of blood sugar in the clinical laboratory.

Die Blutzuckerbestimmung mit *o*-Toluidin (1, 2) gehört seit einigen Jahren wegen der Spezifität, der geringen Störanfälligkeit und der einfachen Durchführung zu den Standard-Methoden der klinischen Laboratorien. Allerdings besitzt sie im Vergleich zur enzymatischen Blutzuckerbestimmung einen Nachteil: Durch die Verwendung von Eisessig als Lösungsmittel kommt es fast bei allen Schritten der Analyse (z. B. beim Pipettieren des Reagenzes, bei der Durchführung der Farbreaktion im siedenden Wasserbad, beim Messen am Photometer) und beim Reinigen der Gefäße zu einer Geruchsbelästigung. Wenn pro Tag einige Hundert Analysen durchgeführt werden, was in größeren Kliniken häufig vorkommt, wird der Essigsäuredampf zum ernststen Problem.

Man hat versucht, durch Verwendung von 50proz. Essigsäure diesen Nachteil zu verringern (3). Dabei mußte jedoch eine längere Reaktionszeit und eine geringere Farbausbeute in Kauf genommen werden (siehe Abb. 1), so daß sich das Verfahren in der Praxis nicht durchsetzen konnte. Aus diesem Grund wurde nach Möglichkeiten gesucht, die Blutzuckerbestimmung mit Hilfe der *o*-Toluidin-Methode ohne Eisessig durchzuführen.

Untersuchungen über die *o*-Toluidin-Methode

Glucose bildet mit *o*-Toluidin in Eisessig in der Hitze einen grünen Farbstoff. Die Lösung besitzt je ein Extinktionsmaximum bei 380 nm, bei 480 nm und bei 620 nm. Während Ketosen unter den gleichen Reaktionsbedingungen ebenfalls eine Absorption im nahen UV-Bereich und Pentosen ein Extinktionsmaximum bei 480 nm ergeben, ist das 620 nm-Maximum für Aldohexosen spezifisch. Anstelle von *o*-Toluidin können auch andere aromatische Amine mit einer freien und einer Alkyl-substituierten *o*-Stellung verwendet werden (z. B. 2,3- oder 2,4- oder 2,5-Xylidin). Dagegen bilden Anilin, *m*- und *p*-Toluidin sowie 3,4-, 3,5- und 2,6-Xylidin und viele andere aromatische

Amine mit Aldohexosen nur das unspezifische Maximum im UV-Bereich. Auch hinsichtlich der Störbarkeit durch andere Verbindungen bestehen große Unterschiede zwischen der Anilin-Methode (380 nm) und der *o*-Toluidin-Methode (620 nm) (z. B. wird durch Mineralsäuren die Ausbildung des 620 nm-Maximums verhindert, während die des UV-Maximums verstärkt wird). Aus diesen Gründen beschränken sich die nachfolgenden Untersuchungen nur auf das „Aldohexose-spezifische“ Maximum und sind nicht immer auf das sogenannte Anilin-Eisessig-Verfahren anwendbar,

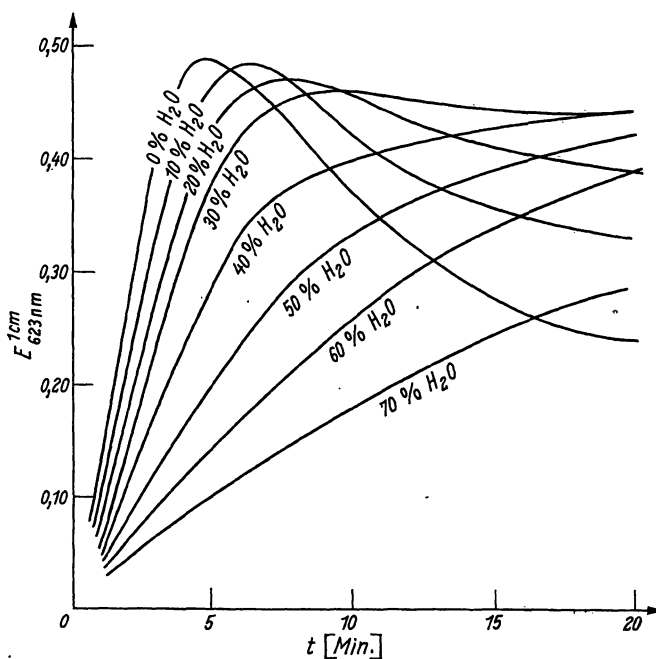


Abb. 1
o-Toluidin-Methode mit Eisessig:
Farbentwicklung in Abhängigkeit von der Zeit für verschiedene Wassergehalte im Reaktionsgemisch
Reagenz: 10 ml *o*-Toluidin
100 ml Eisessig-Wasser-Gemisch
0,1 g Thioharnstoff
Analyse: 0,4 ml Glucose-Standard (20 mg/100 ml)¹⁾
2 ml Reagenz

¹⁾ wasserfreie Glucose

obwohl dieses Verfahren manchmal als Variante der *o*-Toluidin-Methode angesehen wird.

Es empfiehlt sich nicht, den Eisessig durch die üblichen Säuren zu ersetzen. Im Falle der aliphatischen Monocarbonsäuren ist die Geruchsbelästigung zu stark bzw. die Löslichkeit im wäßrigen Medium zu gering. Die Dicarbonsäuren sind fest und auch mit den in Frage kommenden Lösungsvermittlern nicht in ausreichender Konzentration in Lösung zu bekommen. Außerdem treten mit *o*-Toluidin häufig Ausfällungen auf. Bei Verwendung von Halogenfettsäuren oder Thiosäuren oder anorganischen Säuren erhält man keine bzw. nur äußerst geringe Farbausbeuten.

Ferner verhindert der Ersatz des Eisessigs durch organische Lösungsmittel die Entstehung des Farbstoffes.

Dagegen ist es möglich, den Eisessig vollständig durch eine Lösung von Hydroxycarbonsäuren in hydroxylgruppenhaltigen organischen Lösungsmitteln zu ersetzen. Dieses Reaktionsmedium bewirkt im Gegensatz zum Eisessigreagenz keine Geruchsbelästigung. Es liefert darüber hinaus bei geeigneter Wahl der Reaktionsbedingungen sogar höhere Farbausbeuten.

Für die Verwendung der im reinen Zustand kristallinen Hydroxycarbonsäuren sind Lösungsvermittler notwendig. Die genannten hydroxylgruppenhaltigen organischen Lösungsmittel sind hierfür bestens geeignet, da sie die Farbreaktion nicht bzw. kaum stören. Wegen der höheren Siedepunkte werden Propanol und Äthylenglycolmonomethyläther bevorzugt. Es ist vorteilhaft, die Säure so weit wie möglich durch das Lösungsmittel zu ersetzen, da hierdurch die Viskosität der Reaktionslösung erniedrigt wird. Bei zu geringer Säurekonzentration sind jedoch die Reaktionszeiten zu lang und die Farbausbeuten zu klein: optimal ist eine Konzentration

von 20–35% (siehe Abb. 2). Zur weiteren Erniedrigung der Viskosität und zur Verringerung der Gelbfärbung des Reagenzes kann man schließlich noch eine geringe Menge Methanol zusetzen, wobei während der kurzen Erhitzungszeit bei Gehalten unter 10% kaum Verdunstungsverluste zu befürchten sind (siehe Abb. 3).

Von den Hydroxycarbonsäuren sind Glycolsäure und Milchsäure am besten geeignet, da sie aus den handelsüblichen technischen Lösungen in der erforderlichen Reinheit durch mehrfaches Umkristallisieren bzw. durch Hochvakuum-Destillation hergestellt werden können. In geringen Konzentrationen können auch Äpfel- und Weinsäure für die Blutzuckerbestimmung verwendet werden. Die Verwendung von Citronensäure bedingt oft Nachteile, da die handelsüblichen Produkte Spuren von Aldosen enthalten, die sich nur schwer abtrennen lassen. Außerdem ist die Viskosität der Lösungen relativ hoch, so daß Schlieren in der Meßküvette sich nicht genügend ausgleichen und Fehler verursachen können.

Wie bei der Verwendung von Eisessig sind auch bei Verwendung von Hydroxycarbonsäuren die Geschwindigkeit der Farbbildung und die Farbausbeute stark vom Wassergehalt der Reaktionslösung abhängig. Ohne Wasser bildet sich der grüne Farbstoff verhältnismäßig schnell. Er ist aber auch relativ unbeständig, so daß die Erhitzungszeit genau eingehalten werden muß. Dagegen entsteht der Farbstoff in Gegenwart von wenig Wasser langsamer, er ist aber auch in der Hitze stabiler. Bei Wassergehalten über 30% ist die Farbbildung für eine Routine-Blutzuckerbestimmung bereits zu langsam.

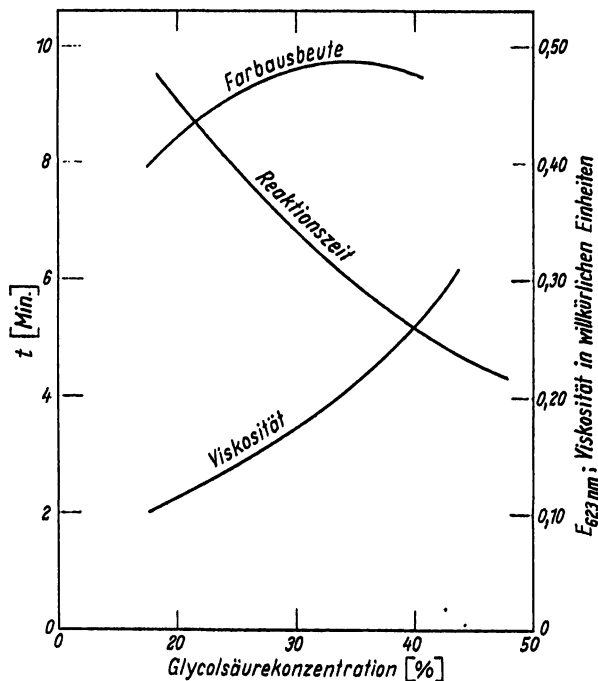


Abb. 2

Einfluß der Glycolsäurekonzentration auf die optimale Reaktionszeit, auf die Farbausbeute und auf die Viskosität der Reagenzlösungen
 Reagenz: 1,0 ml *o*-Toluidin
 9 ml Glycolsäure-Äthylenglycolmonomethyläther-Gemisch
 Analyse: 10 mg Thioharnstoff
 0,2 ml Glucose-Standard (20 mg/100 ml)
 2 ml Reagenz

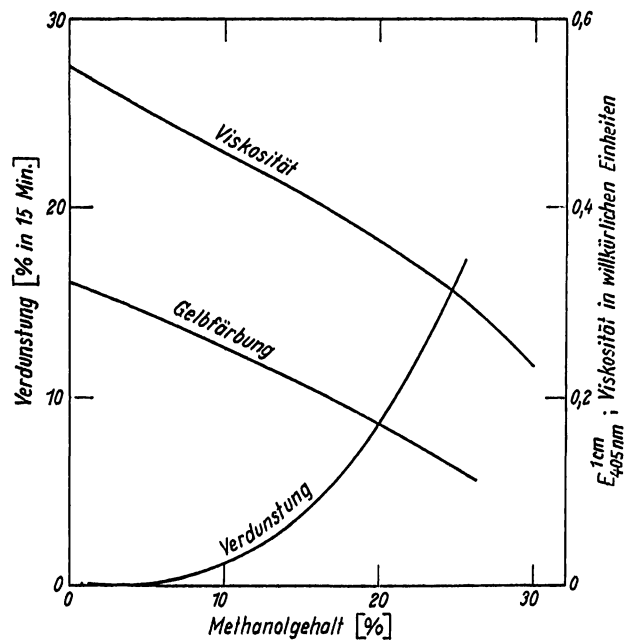


Abb. 3

Einfluß des Methanol-Gehaltes auf die Viskosität, auf die Gelbfärbung und auf die Verdunstungsverluste des Reagenzes im siedenden Wasserbad
 Reagenz: 3,0 g Glycolsäure
 1 ml *o*-Toluidin
 10 mg Thioharnstoff
 6 ml Methanol-Äthylenglycolmonomethyläther-Gemisch

Die Konzentration des aromatischen Amins, z. B. des *o*-Toluidins, beeinflusst die Farbausbeute und die Beständigkeit des gebildeten Farbstoffes (siehe Abb. 4). Wegen der Zunahme der Zersetzungsgeschwindigkeit bei höherer *o*-Toluidin-Konzentration empfiehlt es sich, unter Verzicht auf maximale Farbausbeute bei einer Konzentration von etwa 6% *o*-Toluidin zu arbeiten. Die Ergebnisse der Versuche zur Ermittlung optimaler Reaktionsbedingungen, die nach den Kriterien Geschwindigkeit der Farbbildung, Farbausbeute und Konstanz der Farbe beurteilt werden, sind in den Abbildungen 2—5 für das Beispiel Wasser/Glycolsäure/Äthylenglycolmonomethyläther dargestellt. Bei Verwendung anderer Hydroxysäuren bzw. hydroxygrup-

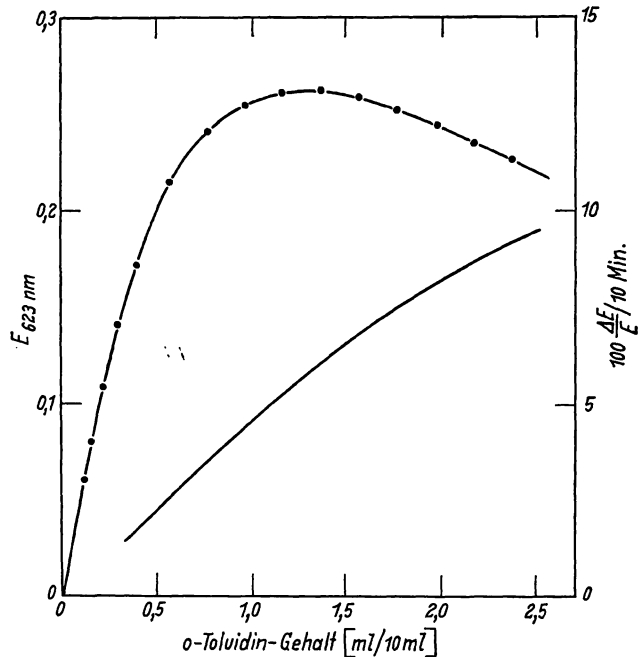


Abb. 4

—•—•—•— Farbausbeute in Abhängigkeit vom *o*-Toluidin-Gehalt des Reagenz
 - - - - - Zersetzung des gebildeten Farbstoffes in Abhängigkeit vom *o*-Toluidingehalt des Reagenz bei 25°

Reagenz: 3 g Glycolsäure
 10 mg Thioharnstoff
 7 ml *o*-Toluidin-Äthylenglycolmonomethyläther-Gemisch
 Analyse: 0,2 ml Glucose-Standard (10 mg/100 ml)^{a)}
 2 ml Reagenz

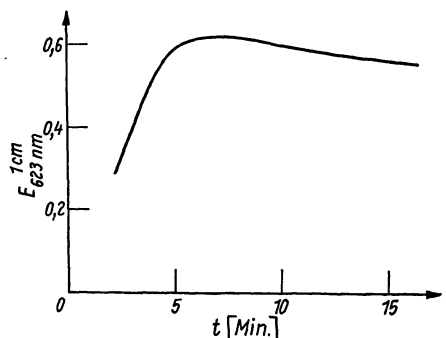


Abb. 5

o-Toluidin-Methode ohne Eisessig
 Farbentwicklung in Abhängigkeit von der Erhitzungszeit

Reagenz: 1,0 ml *o*-Toluidin
 0,5 ml Methanol
 1,5 g Glycolsäure
 1,5 g Äpfelsäure
 10 mg Thioharnstoff
 5,5 ml Äthylenglycolmonomethyläther

penhaltiger Lösungsmittel bzw. Amine erhält man ähnliche Zusammenhänge zwischen den einzelnen Parametern; die Farbausbeuten sind jedoch meist etwas geringer und die Maxima häufig etwas verschoben. Optimal ist ein Reaktionsgemisch, das aus 1 Teil *o*-Toluidin, 0,01 Teilen Thioharnstoff, 1,5 Teilen Wasser, 4,5 Teilen Äthylenglycolmonomethyläther, 1 Teil Methanol, 1,2 Teilen Glycolsäure und 1,2 Teilen Äpfelsäure besteht. Da die Farbausbeute fast doppelt so hoch wie bei der Verwendung des üblichen *o*-Toluidin-Eisessig-Reagenzes ist, kann man ein kleineres Volumen des eiweißfreien Überstandes (0,2 ml Überstand anstelle von 0,4 ml pro 2 ml Reagenz) zur Analyse verwenden.

Methodik²⁾

1. Glucosebestimmung in Vollblut, Serum oder Plasma Farbreaenz

12 g Glycolsäure, 12 g Äpfelsäure, 100 mg Thioharnstoff, 5 ml Wasser, 10 ml Methanol und 10 ml *o*-Toluidin werden in 45 ml Äthylenglycolmonomethyläther gelöst. Bei Raumtemperatur etwa 1 Jahr haltbar.

Enteweißungslösung

5 g Trichloressigsäure in 100 ml Wasser lösen.

Standardlösung

100 mg wasserfreie Glucose in 100 ml 0,15proz. wäbr. Benzoesäurelösung auflösen.

Ausführung

Zu jeder Analysenserie werden nur eine Blind- und ein bis zwei Standardproben angesetzt.

A) Enteweißung: In Zentrifugengläser einpipettieren:

	Analyse	Standard	Blindprobe
Enteweißungslösung	1,0 ml	1,0 ml	—
Vollblut bzw. andere Körperflüssigkeit	0,1 ml	—	—
Standardlösung	—	0,1 ml	—

mischen, Analysenprobe 5 Min. lang zentrifugieren

B) Farbreaktion: In Reagenzgläser einpipettieren:

	Analyse	Standard	Blindprobe
Eiweißfreier Überstand	0,2 ml	—	—
Standardgemisch	—	0,2 ml	—
Enteweißungslösung	—	—	0,2 ml
Farbreaenz	2,0 ml	2,0 ml	2,0 ml

Mischen, 5—6 Min. lang in ein siedendes Wasserbad und dann sofort in kaltes Wasser stellen.
 Nach dem Abkühlen die Extinktionen der Analysen- und der Standardprobe gegen die Blindlösung möglichst kurz hintereinander messen.

Extinktionsmaximum: 625—630 nm

Filter: zwischen 575 und 650 nm z. B. Hg 578; Hg 623; J 62,5

Schichtdicke: 1 cm.

Berechnung:

$$\text{Glucosegehalt} = \frac{E_{\text{Analyse}}}{E_{\text{Standard}}} \cdot 100 \text{ (mg/100 ml)}.$$

²⁾ Diese Methode ist demnächst als Merckotest-Reagenziensatz erhältlich.

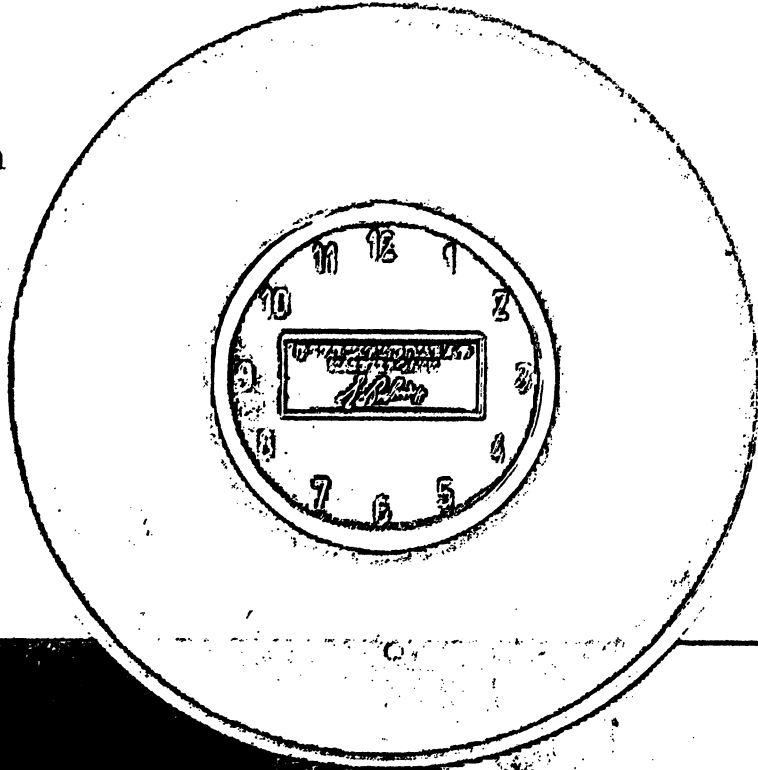


BEHRINGWERKE AG
MARBURG-LAHN

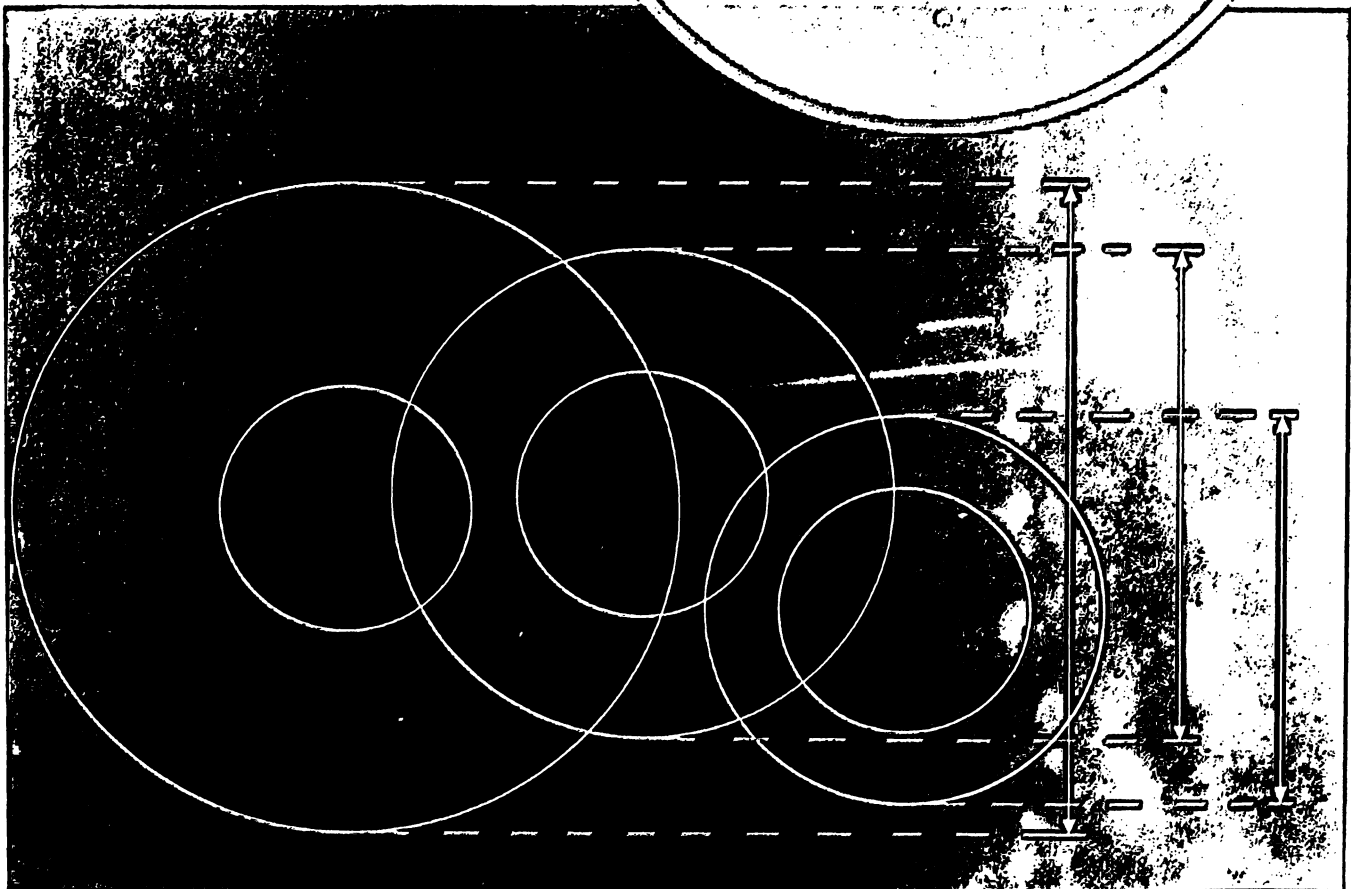
S. Behring

Partigen® Immundiffusionsplatten

Antiserum-haltige
Agargelplatten Behringwerke
für quantitative
Plasmaprotein-Bestimmungen



B 63005



In Kürze erscheint

G. Eßer

Pfortaderhochdruck und Eiweißstoffwechsel

Indikation und metabolische Konsequenzen porto-kavaler Anastomosen bei Leberzirrhosekranken

Von Priv.-Doz. Dr. med. **Gregor Eßer**

Chirurgische Universitäts-Klinik und Poliklinik Bonn (Direktor: o. Prof. Dr. A. Gütgemann)

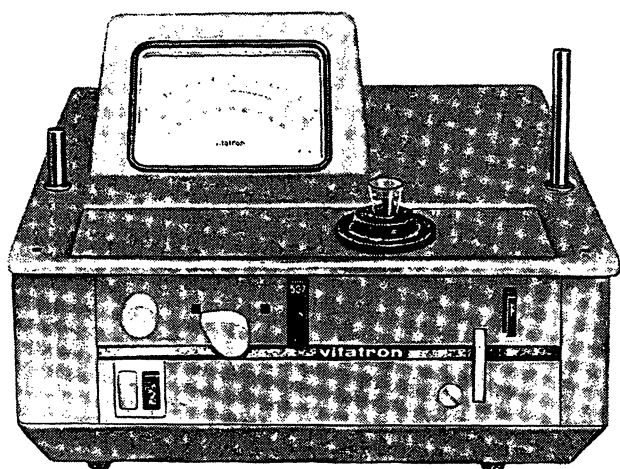
Mit 49 Abbildungen. Oktav. XII, 190 Seiten. 1969. Plastik flexibel DM 36,—

In der ganzen Welt steigen die Krankheiten der Leber an. Die Hepatitis steht mit an der Spitze der Infektionskrankheiten. In der Bundesrepublik übertreffen Leberschäden die Frequenz der Tuberkulosefälle. Die Anzahl der Leberkranken entspricht annähernd der der Zuckerkranken.

Die vorliegende Arbeit wurde in der Absicht geschrieben, anhand der Erfahrungen an einem einheitlichen großen Krankengut sowie aufgrund tierexperimenteller Studien eine allgemeine sowie spezielle Orientierung über Indikationsgrenzen und Behandlungsprobleme der porto-kavalen Anastomose bei Leberzirrhosekranken mit Pfortaderhochdruck zu geben. Es war Bestreben des Autors, sowohl dem am Problemkreis der portalen Hypertension besonders interessierten Kliniker und Wissenschaftler als auch dem Allgemeinpraktiker einen Einblick in die Pathophysiologie des Pfortaderhochdrucks und der Pfortaderchirurgie zu vermitteln. Gleichzeitig aber sollte diese Arbeit den in der Praxis tätigen Hausärzten und Fachärzten eine Hilfe für die Auslese operativ zu behandelnder blutungsgefährdeter Leberzirrhosekranker und in der postoperativen Weiterbehandlung dieser Patienten sein.



WALTER DE GRUYTER & CO · BERLIN 30



Wir sind sicher:

**Das VITATRON UC 200
PRÄZISIONS-COLORIMETER**
ist eines der stabilsten
Ein-Strahl-Photometer der Welt.

Es hat die Stabilität und Linearität eines Doppel-Strahl Monochromator-Gerätes, kostet aber weniger als die Hälfte.

Wir können Ihnen hier nicht all seine Vorzüge beschreiben. Aber wenn Sie in Ihrem Labor ein wenig Platz übrig haben (nur 32 cm x 32 cm),



dann führen wir es Ihnen gern vor. Sollten Sie noch etwas mehr Platz haben (30 cm x 43 cm), dann bringen wir auch unseren VITATRON-DIGITALWANDLER mit. Er druckt automatisch die Photometeranzeige als Konzentration oder Extinktion aus, zusammen mit der Proben-Nummer. Fordern Sie bitte weitere Informationen an! Unsere Service-Station ist in Ihrer Nähe.

vitatron

Vitatron GmbH

5024 Pulheim, Postfach 9 · Ruf: Stommeln 02238/7312

VH 14 G

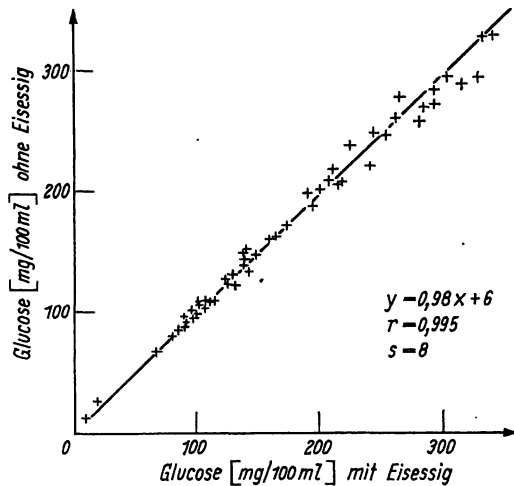


Abb. 6

Vergleich der *o*-Toluidin-Methode mit Eisessig (Merckostest) mit oder ohne Eisessig
Glucose-Bestimmung im Serum

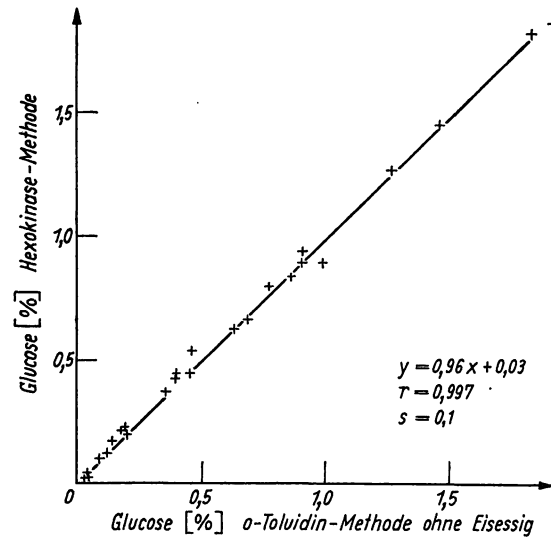


Abb. 7

Vergleich der *o*-Toluidin-Methode (ohne Eisessig) mit der Hexokinase-Methode
Glucose-Bestimmung in Diabetiker-Urinen

2. Glucosebestimmung im Liquor und im Urin

Anmerkung:

Die Anwendung dieser Methode setzt voraus, daß das Volumen von 0,02 ml sehr genau pipettiert wird. Falls keine geeigneten Pipetten zur Verfügung stehen, wird der Urin, bzw. der Liquor nach der für Vollblut bzw. Serum angegebenen Vorschrift untersucht. Unter Verzicht auf Genauigkeit kann aber auch im Serum und Plasma der Glucosegehalt nach dieser Schnellmethode bestimmt werden.

Verdünntes Farbreagensz

10 Teile des oben beschriebenen Farbreagensz werden mit 1 Teil Wasser verdünnt.

Ausführung:

Zu jeder Analysenserie werden nur eine Blind- und 1–2 Standardproben angesetzt.

In Reagenzgläser pipettieren:

	Analyse	Standard	Blindprobe
Liquor bzw. Urin	0,02 ml	—	—
Standardlösung	—	0,02 ml	—
Verdünntes Farbreagensz	2,0 ml	2,0 ml	2,0 ml

mischen, 5–6 Min. lang in ein siedendes Wasserbad und dann sofort in kaltes Wasser stellen. Nach dem Abkühlen die Extinktionen der Analysen- und Standardlösungen gegen die Blindlösung möglichst kurz hintereinander messen. Bei Extinktionen über 1,5 0,5 cm-Küvette verwenden oder 1 ml der Analysen-Lösung mit 4 ml verdünntem Reagens verdünnen, messen und das Ergebnis mit 5 multiplizieren.

Literatur

1. HULTMANN, E., Nature London 183, 108 (1953).
2. HYVÄRINEN, A. und E. A. NIKKILÄ, Clin. chim. Acta Amsterdam 7, 140 (1962).
3. BRAUN, H., Ärzt. Lab. 13, 177 (1967).

Ergebnisse

Die Brauchbarkeit der neuen Methode zeigt sich bei Paralleluntersuchungen von eiweißfreien Überständen und von Urinproben mit der alten und der neuen *o*-Toluidin-Methode und der Hexokinase-Methode. Die Ergebnisse sind für die mittleren Konzentrationsbereiche in den Abbildungen 6 und 7 dargestellt. Man findet keine signifikanten Unterschiede in den gemessenen Glucose-Werten. Wegen der genannten Vorteile (keine Geruchsbelästigung, größere Empfindlichkeit) ist die neue Variante der alten *o*-Toluidin-Eisessig-Methode jedoch eindeutig überlegen.

Wir danken Fräulein R. FINKENAUER, Frau A. HIMSEL, Fräulein H. KOHLSCHÜTTER und Frau E. ATANASOVA für die Durchführung der Versuche.

Dr. A. Härtel
E. Merck AG
Biochemische Abteilung
61 Darmstadt 2, Postfach 4119