Utrecht University Library
Partner in Science
Universiteit Utrecht

Bijdrage tot de kennis der suikers van het bloed

https://hdl.handle.net/1874/263174

Nr 192, 1910

BIJDRAGE TOT DE KENNIS DER SUIKERS VAN HET BLOED



J. W. BEST

BIJDRAGE TOT DE KENNIS DER SUIKERS VAN HET BLOED

RIJKSUNIVERSITEIT UTRECHT
1404 8601

BIJDRAGE TOT DE KENNIS DER SUIKERS VAN HET BLOED

PROEFSCHRIFT TER VERKRIJGING VAN DEN GRAAD VAN DOCTOR IN DE GENEESKUNDE AAN DE RIJKS-UNIVERSITEIT TE UTRECHT, OP GEZAG VAN DEN RECTOR MAGNIFICUS DR. P. VAN ROMBURGH, HOOGLEERAAR IN DE FACULTEIT DER WIS- EN NATUURKUNDE, VOLGENS BESLUIT VAN DEN SENAAT DER UNIVERSITEIT TEGEN DE BEDENKINGEN VAN DE FACULTEIT DER GENEESKUNDE TE VERDEDIGEN OP DINSDAG 14 MEI 1918, DES NAMIDDAGS TE 4 UUR, DOOR

JAN WILLEM BEST, ARTS, GEBOREN TE ZIERIKZEE



ELECTRISCHE DRUKKERIJ L. E. BOSCH & ZOON - UTRECHT

De voltooiing van mijn proefschrift verschaft mij de welkome gelegenheid, U, Hoogleeraren en Lectoren der Medische en Philosophische Faculteiten, mijn hartelijken dank te betuigen voor het van U ontvangen onderwijs.

In het bijzonder geldt die dank U, Hooggeleerde PEKELHARING, Hooggeachte Promotor, voor de groote bereidwilligheid, waarmee Gij Uzelf steeds voor mij hebt beschikbaar gesteld, reeds van mijn eerste studiejaren af, en vooral gedurende de bearbeiding van dit proefschrift. Nu ik in Indië in de gelegenheid zal zijn, verder te werken in de richting, waarin Gij mij hebt geleid, is het mij te meer een voorrecht, U als leermeester te hebben gehad. Uw objectiviteit en kritische zin zullen mij steeds voor oogen staan. Uw raad, en niet minder Uw persoonlijken invloed, zal ik slechts noode missen.

Zeergeleerde VAN HERWERDEN en Zeergeleerde RINGER, ook U beiden dank ik voor alle belangstelling en hulp, die ik gedurende de jaren, waarin ik onder Uw leiding of in Uw nabijheid werkte, van U heb ondervonden.

INHOUD.

Bladz.

INLEIDING. . . . . 1.

OVERZICHT DER LITERATUUR . . . . . 5.

EIGEN ONDERZOEK:

I. Onderzoek der suikers van runder- en paardenbloed door middel van phenylhydrazine . . . . . 41.

II. Bereiding van osazon uit het bloed na verwijdering der vergistbare suikers door zuiver gekweekte gistcellen 52.

III. Over de bepaling van het reduceerend vermogen van vloeistoffen met het reagens van S. R. BENEDICT . . 61.

IV. Het reduceerend vermogen van het bloeddecoct van rund en paard vóór en na gisting . . . . . 75.

V. Hydrolyse der koolhydraten van runderbloed door koken met verdunde zuren. . . . . 90.

VI. Nog eenige reacties op suikers in het bloed. . . . . 102.

VII. Over den aard der suikers van het bloed van den mensch 112.

VIII. Bepaling van de hoeveelheid suikers in runder- en paardenbloed . . . . . 114.

IX. Wijziging der reductie-methode van BENEDICT, zoodat ook geringe hoeveelheden reduceerende stof ermee kunnen worden bepaald . . . . . 121.

X. Suikerbepalingen in menschenbloed. . . . . 129.

INLEIDING.

Voor de oplossing van de meeste vraagstukken, waarvoor de onderzoeker van de koolhydraatstofwisseling en haar afwijkingen zich geplaatst ziet, is een nauwkeurige kennis van de koolhydraten van het bloed een eerste vereischte. In de laatste halve eeuw zijn dan ook in de physiologische en klinische tijdschriften een groot aantal mededeelingen verschenen, die betrekking hebben op wat men »de bloedsuiker« noemt.

Bij het doorlezen dezer literatuur over de bloedsuiker is het zeer opmerkelijk: dat verreweg de meeste onderzoekingen gewijd zijn aan het bepalen van de *hoeveelheid* suiker, in het bloed aanwezig, waarbij dan onder gehalte aan bloedsuiker steeds wordt verstaan: het gehalte aan *glycose* van het bloed.

Inderdaad staat thans wel vast, dat in het normale bloed de koolhydraten voor het grootste gedeelte in den vorm van d-glycose aanwezig zijn, en dat in de koolhydraatstofwisseling naast glycogeen glycose de grootste rol speelt. Toch moet het een eenzijdigheid in de richting van het onderzoek genoemd worden, dat het deelnemen van andere koolhydraten dan glycose en glycogeen aan de koolhydraatstofwisseling, en de aanwezigheid van andere koolhydraten dan glycose in het bloed, meestal geheel buiten rekening gelaten wordt. Zoo ontmoet men herhaaldelijk uitspraken als deze: »Wir wollen bei physiologischen Untersuchungen im allgemeinen doch nur

dasjenige Kohlenhydrat quantitativ fassen, das dauernd mit den am Kohlenhydratstoffwechsel beteiligten Organen in Aktion tritt. Dies ist aber nach den zurzeit geltenden Vorstellungen für gewöhnlich nur der Traubenzucker und zwar zum überwiegenden Teile in freigelöster Form.«[1]) En zelfs BANG[2]) schrijft in de inleiding zijner monographie over bloedsuiker: ». . . . . die Kohlenhydrate, die in unsrem Falle mit Traubenzucker identisch sind . . . .«. En dat, terwijl de physiologische chemie heeft geleerd, dat ook andere suikers dan glycose in het dierlijke organisme voorkomen! Om er maar eenige te noemen: de pentose (xylose volgens NEUBERG, ribose volgens LEVENE), welke deel uitmaakt van inosinezuur, een nucleïnezuur van het spierweefsel, en de pentose (pentosen?) van de nucleoproteïden van andere weefsels en organen *); galactose, als bestanddeel van cerebrosiden in het zenuwweefsel aangetoond; lactose, die tijdens de lactatie-periode der vrouwelijke dieren in groote hoeveelheid, en (blijkens onderzoekingen van de laatste jaren[3])) door een enzym van het bloedserum (ook van mannelijke dieren) kan worden gevormd (zie ook p. 22); de intermediaire suikers als maltose, iso-maltose, en hoogere koolhydraten, welke bij de digestie van zetmeel en bij de omzetting glycose⇄glycogeen ontstaan; en het dextrine-achtige polysaccharide, hetwelk (althans dat van de urine) bij hydrolytische splitsing geen glycose, maar een nog onbekende,

*) Volgens MOREL en FRAISSE [Bulletin de la Soc. chimique de France, 4me série, tome I, p. 660 (1907)] hebben de hoogst gedifferentiëerde organen (pancreas, lever, testis, hersenen) het hoogste gehalte aan pentosen.

1) E. FRANK: Zeitschr. f. physiol. Chemie 70, 130 (1910).
2) IVAR BANG: Der Blutzucker, p. 1 (1913).
3) RÖHMANN: Biochem. Zeitschr. 61, 464 (1914); 84, 382 (1917).

onvergistbare suiker levert, die noch een hexose, noch een pentose is. [1])

En nu zou men bij het onderzoek van de koolhydraat-stofwisseling alleen met de glycose rekening behoeven te houden, of de glycose-stofwisseling geheel onafhankelijk van die van de andere koolhydraten mogen beschouwen? Dit is reeds daarom ongeoorloofd: daar de verschillende koolhydraten van het organisme allen in nauw verband tot elkaar staan, en het dus waarschijnlijk is, dat zij in elkaar kunnen overgaan. Niet alleen voor glycose → → maltose (iso-maltose) → amylum (glycogeen), voor glycose → fructose, en voor glycose → galactose → lactose is dit het geval; maar ook voor hexosen en pentosen: de onderzoekingen van SALKOWSKI en NEUBERG [2]) hebben n.l. aan het licht gebracht, dat d-glycuronzuur (onvolledig oxydatie-product van glycose) in bepaalde omstandigheden — zoo o. a. onder invloed van rottingsbacteriën — koolzuur afsplitst en in l-xylose overgaat.

Door de suiker van het bloed als glycose te beschouwen laat men ook bij de quantitatieve bepaling van de bloed-suiker een bron van fouten buiten rekening; immers: er is geen enkele methode in gebruik, welke nauwkeurig het gehalte aan glycose-alleen aangeeft. Wanneer we afzien van de minder nauwkeurige methoden, waarbij de bloedsuiker met den polarimeter of langs colorimetrischen weg wordt bepaald, vinden we als meest gebruikelijke methode: de bepaling van het reduceerend vermogen; en het is niet mogelijk, de glycose van het bloed zonder verlies in zuivere oplossing te verkrijgen: steeds blijft zij vermengd met andere suikers (en nog andere stoffen),

---

[1]) PEKELHARING en VAN HOOGENHUYZE: Über die CAMMIDGE'sche Pankreasreaktion. Zeitschr. f. physiol. Chemie **91**, 151 (1914).

[2]) Zeitschr. f. physiol. Chemie **36**, 261 (1902).

die eveneens reduceerende eigenschappen hebben. — Bepaling van de hoeveelheid glycose in het bloed door reductie-bepaling vóór en na gisting heeft tot nog toe ook geen betrouwbare uitkomsten gegeven, daar de gebruikte gist reduceerende stoffen aan de vloeistof bleek af te staan.

Tenslotte zij nog opgemerkt, dat de naast glycose in het bloed voorkomende reduceerende stoffen — in normale omstandigheden slechts in geringe, vrijwel constante hoeveelheden aanwezig — in pathologische gevallen sterk in hoeveelheid kunnen toenemen. —

Uit het bovenstaande blijkt, dat voor een juist inzicht in de koolhydraatstofwisseling ook de naast glycose in het bloed voorkomende koolhydraten moeten worden onderzocht. Tot de kennis van den aard dier koolhydraten een bijdrage te leveren is het doel van dit proefschrift.

Eerst wanneer uitgemaakt is, welke koolhydraten naast glycose wel en welke niet in het bloed voorkomen, zal het misschien mogelijk zijn, betrouwbare methoden voor de quantitatieve bepaling dier koolhydraten afzonderlijk te vinden, en de waarde van de thans in gebruik zijnde methoden voor de bepaling van glycose in het bloed te beoordeelen.

OVERZICHT DER LITERATUUR.

Van de geheele literatuur, welke op de bloedsuiker betrekking heeft, een overzicht te geven, zou ver buiten het gebied van dit proefschrift vallen. Daarvoor zij verwezen o.a. naar de uitvoerige historische overzichten, die men kan vinden in: MAX SALOMON: Geschichte der Glukosurie von Hippokrates bis zum Anfange des 19en Jahrhunderts (Deutsches Archiv für klin. Medizin 1870); CLAUDE BERNARD: Leçons sur le Diabète et sur la Glycogénèse animale (Paris 1877); R. LÉPINE: Le Diabète sucré (Paris 1909); en I. BANG: Der Blutzucker (Wiesbaden 1913).

Wanneer we alles, wat over de methodiek en de uitkomsten der quantitatieve bepaling der bloedsuiker geschreven is, buiten beschouwing laten, blijft, wat de qualiteit der in het bloed voorkomende suiker betreft, slechts een betrekkelijk gering aantal publicaties ter bespreking over.

De eerste onderzoekingen betreffende suiker in het bloed werden bij lijders aan diabetes mellitus verricht. Als men bedenkt, hoe gebrekkig in het begin der 19de eeuw de methoden van onderzoek nog waren (indamping van het zoo goed mogelijk van eiwit bevrijde bloed of serum; kristalvorm en smaak van de ingedampte massa; bruinkleuring en verharsing bij verhitting met alkaliën; gisting van de suiker in oplossing), en hoe talrijk de

bronnen van fouten (invloed der glycolyse; verwarming bij alkalische reactie), — dan is het niet te verwonderen, dat tegenstrijdige uitkomsten werden verkregen. Door de onderzoekingen van DOBSON (1775), ROLLO (1797), WOLLASTON (1811), ROCHOUX (1823) en AMBROSIANI (1835) werd echter de aanwezigheid van een suikerachtige stof in het bloed van diabetes-lijders wel boven twijfel gesteld. Dat deze stof dezelfde zou zijn als de suiker, die door WILLIS (1674) in diabetische urine was geproefd, door DOBSON en POOL in 1774 daaruit bereid, en door CHEVREUL [1]) in 1815 als druivensuiker herkend, kon nog slechts worden vermoed.

MAC GREGOR (1837), BOUCHARDAT (1839), FRANZ SIMON (1842) e. a. vonden bij diabetes-lijders na den maaltijd wel suiker in het bloed, 's morgens vóór het ontbijt echter niet. Deze waarnemingen, en vooral ook de belangrijke ontdekking van TIEDEMANN en GMELIN [2]) (1826): dat in den darm uit zetmeel suiker gevormd wordt, gaven aanleiding een verband aan te nemen tusschen de aanwezigheid van suiker in het bloed en den aard der voeding. Aldus ontstond tegenover de leer, dat suiker uitsluitend bij diabetici als pathologisch product zou voorkomen, de veronderstelling: dat de dierlijke suiker van de plantaardige koolhydraten afkomstig is, en dus ook in het normale lichaam tijdelijk aanwezig kan zijn. Van dezen tijd dateeren dan ook de eerste onderzoekingen van het normale bloed. Aan TIEDEMANN en GMELIN [3]) komt de eer toe, het eerst in het normale bloed suiker te hebben aangetoond (met de gistproef), en wel in het bloed van honden na voeding met kool-

1) Annales de Chimie **95**, 320 (1815).
2) Die verdauung nach Versuchen, I, p. 184—186 (1826).
3) l c.

hydraten. MAC GREGOR [1]) onderzocht het bloed van gezonde menschen bij vegetarisch diëet, en vond daarin »a trace of sugar«. THOMPSON [2]) bevestigde de waarnemingen van TIEDEMANN en GMELIN voor kippenbloed. Met de proef van TROMMER vond MAGENDIE [3]) bij honden na aardappelvoeding en bij paarden na havervoeding suiker in het bloed, en daarnaast een stof, die door alcohol uit de waterige oplossing kon worden neergeslagen en de eigenschappen van »dextrine« vertoonde. In het bloed van konijnen, die 3 dagen gehongerd hadden, kon MAGENDIE geen suiker aantoonen.

Deze en nog meer onderzoekingen moesten wel tot de meening leiden, dat de bloedsuiker van het normale dier de geresorbeerde voedingssuiker is. Eerst verbeteringen in de methodiek (reductie-methoden van BARRESWILL, later van FEHLING) en het systematische onderzoek van CLAUDE BERNARD brachten de onjuistheid dezer meening aan het licht. CL. BERNARD [4]) onderzocht honden na vleeschvoeding en na 2 dagen hongeren, en ontdekte, dat het bloed van de venae hepaticae en van het rechterhart suiker bevatte. Zonder BERNARD's onderzoekingen te kennen vond C. SCHMIDT [5]), dat in het bloed der groote circulatie van gezonde en zieke menschen en van runderen, honden en katten steeds suiker voorkomt, — in het bloed der katten zelfs na 3 dagen van uitsluitend vleeschvoeding en na 5 dagen hongeren. Hoewel tegen BERNARD's eerste onderzoekingen wel eenige gegronde bezwaren waren in te brengen, heeft hij door zijn latere proeven de suiker-

---

[1]) London Medical Gazette **20**, 272 (1837).
[2]) Philosophical Mag. **26**, 423 (1845).
[3]) Comptes rendus de l'Acad. des Sciences **23**, 189 (1846).
[4]) Archives générales de Médecine **18**, 305 (1848).
[5]) Characteristik der epidemischen Cholera, p. 161—163 (1850).

vorming door de lever boven allen twijfel kunnen vaststellen. Daarentegen heeft BERNARD zijn meening, dat alle suiker in de longen zou worden verbrand en dat het bloed der groote circulatie geheel vrij van suiker is, moeten laten varen, nadat in 1855 door FIGUIER [1]), in 1856 door CHAUVEAU [2]), en na hen door vele anderen was bewezen, dat bij vleeschvoeding en bij hongeren ook in de periphere bloedvaten en in de v. portae suiker aantoonbaar is. [3])

Zoo werd dus omstreeks 1870 algemeen aangenomen, dat in het bloed van een levend dier steeds en in alle vaatgebieden suiker voorkomt. Dat deze suiker glycose zou zijn, kon echter altijd nog slechts een vermoeden genoemd worden; want de gistproef en de reductie-methode waren nog de eenige methoden, waarover men voor de herkenning en de bepaling van suikers beschikte.

In 1875 ontdekte ABELES [4]) (bij honden en konijnen), en kort daarna EWALD [5]) (bij gezonde menschen), dat de reduceerende stof van het normale bloed het gepolariseerde licht naar rechts draait. Toch was ook hierdoor de aanwezigheid van glycose in het bloed nog niet met zekerheid aangetoond; want b.v. ook maltose heeft reduceerend en rechtsdraaiend vermogen en wordt door biergist vergist. Bij aanwezigheid van maltose zou echter het rechtsdraaiend vermogen der bloedsuiker haar reduceerend vermogen (alles als glycose berekend) moeten overtreffen. Bij SEEGEN's proeven bleek dit niet het geval

---

[1]) Gazette hebdomadaire **2**, 83, 236, 634, 779 (1855). En: Comptes rendus de l'Acad. des Sc. **45**, 132 (1857).

[2]) Comptes rendus de l'Acad. des Sc. **42**, 1008 (1856).

[3]) Comptes rendus de l'Acad. des Sc. **82**, 1405 (1876). En: Leçons sur le Diabète, p. 209 en 243 (1877).

[4]) Wiener mediz. Wochenschr. **25**, 343 (1875).

[5]) Berliner klin. Wochenschr. **12**, 689 en 701 (1875).

te zijn: hij vond in hetzelfde bloedextract door gisting 0,79 °/₀, door polarisatie 0,75 °/₀, en door reductie (volgens FEHLING-SOXHLET) 0,81 °/₀ glycose [1]).

Het strikte bewijs, dat in het bloed glycose voorkomt, werd eindelijk geleverd, toen E. FISCHER's reagens (azijnzure phenylhydrazine) op de uit bloed bereide suikeroplossing werd toegepast: daarmee konden VON JAKSCH [2]) (uit menschenbloed) en PICKARDT [3]) (uit runder- en hondenbloed) een osazon bereiden, dat in kristalvorm, oplosbaarheid en smeltpunt bleek overeen te stemmen met phenylglycosazon. Alle latere onderzoekers hebben deze waarneming kunnen bevestigen.

Toen aldus de constante aanwezigheid van glycose in het normale bloed bewezen was, werd nagenoeg algemeen aangenomen, dat de suiker in het bloed *geheel* als glycose voorkomt. Ook PAVY verdedigde deze opvatting nog in 1894 [4]). Men beriep zich hierbij op de onderzoekingen van CLAUDE BERNARD [5]), van PICARD [6]) en anderen, waarbij gevonden was, dat normaal bloed na eenige uren gisting bij 30° zijn reduceerend vermogen geheel verliest. VON JAKSCH en PICKARDT vonden in de met phenylhydrazine verhitte oplossing der bloedsuiker naast glycosazon geen ander osazon; zij zullen daar waarschijnlijk ook niet naar hebben gezocht. Wel was bekend, dat hoogere koolhydraten (glycogeen, dextrinen) in het bloed in geringe hoeveelheid voorkomen; deze polysacchariden waren echter voor de quantitatieve suikerbepaling van

---

[1]) PFLÜGERS Archiv **34**, 394 (1884).
[2]) Zeitschr. f. klin. Medizin **11**, 20 (1886).
[3]) Zeitschr. f. physiol. Chemie **17**, 217 (1892).
[4]) The Physiology of the Carbohydrates, p. 158 (1894).
[5]) Mémoires de la Soc. de Biologie **1**, 121 (1849). [Cit. OTTO, PFLÜGERS Archiv. **35**, 474 (1885)].
[6]) Comptes rendus de l'Acad. des Sc. **88**, 755 (1879).

weinig of geen belang, wanneer men de glycose van het bloed door reductie of gisting trachtte te bepalen. En de afwijkingen, die men [1]) bij deze quantitatieve bepalingen vond, bij vergelijking van de uitkomsten, door reductie, polarisatie en gisting verkregen, werden aan onnauwkeurigheden der methodiek geweten, — zeker niet geheel ten onrechte.

Toch zijn het de quantitatieve onderzoekingen geweest, die het eerst het vermoeden deden ontstaan, dat naast glycose in het bloed ook nog andere reduceerende stoffen voorkomen. Vooral verbeteringen in de methodiek der reductie-bepaling droegen hiertoe bij.

Gewoonlijk werd het reduceerend vermogen der bloedsuikeroplossing volgens de methode van FEHLING-SOXHLET [2]) bepaald: men titreert daarbij, totdat de afgemeten hoeveelheid Fehling's proefvocht juist geheel kleurloos is geworden, en overtuigt zich na affiltreeren van het neerslag van koper-oxydule, dat het filtraat vrij van koper is; indien geen koper-oxydule neerslaat, wordt de afwezigheid van suiker bewezen geacht. PAVY [3]) trachtte de nauwkeurigheid der suikerbepaling te vergrooten door een afgemeten hoeveelheid suikeroplossing één minuut met geringe overmaat van Fehling te koken, dan het afgescheiden oxydule door asbest of glaswol af te filtreeren, door H_2O_2 of HNO_3 te oxydeeren, en de hoeveelheid koper in de aldus verkregen oplossing door middel van den galvanischen stroom te bepalen. Later titreert ook PAVY weer tot kleurloos, en gebruikt daarvoor Fehling's

[1]) Zie o.a.: VON MEHRING: Arch. f. Anat. u. Physiol., physiol. Abtl. (**1877**) p. 379; BLEILE: ibid. (**1879**) pag. 59; SEEGEN: PFLÜGERS Archiv **34**, 388 (1884).

[2]) Zie: VON LIPPMANN, Die Chemie der Zuckerarten, p. 586, (3. Aufl. 1904).

[3]) Proceed. of the Royal Soc. of London **26**, 319 (1877).

proefvocht, waaraan hij, om het koperoxydule in oplossing te houden, een groote hoeveelheid ammonia toevoegt. [1])

Reeds in 1878 wezen WORM MÜLLER en HAGEN [2]) erop, dat deze wijze van reductie-bepaling met Fehling's proefvocht voor het aantoonen en bepalen van kleine hoeveelheden glycose (< 0,5 — 1 %) *in dierlijke vloeistoffen* (als bloed, urine en orgaanextracten) ongeschikt is: het koper-oxydule wordt dan steeds voor een gedeelte in oplossing gehouden en aan de lucht weer geoxydeerd, en men vindt dus te weinig suiker of besluit ten onrechte tot de afwezigheid ervan. WORM MÜLLER en HAGEN zijn van oordeel, dat om deze reden de bepalingen van CLAUDE BERNARD, PICARD, PAVY, enz. onbetrouwbaar zijn. Voor het bepalen van geringe hoeveelheden reduceerende stof gebruiken WORM MÜLLER en HAGEN de titratie-methode volgens KNAPP [3]), waarbij een alkalische oplossing van cyaankwik gereduceerd wordt [4]); daar deze oplossing lang bewaard kan worden, en het gereduceerde kwik volledig neerslaat — zoodat volgens KNAPP de totale hoeveelheid reduceerende stoffen eener oplossing bepaald wordt —, verkozen WORM MÜLLER en HAGEN de reductie-methode van KNAPP boven die van FEHLING. *)

*) Dat volgens Knapp inderdaad kleine hoeveelheden glycose nauwkeurig kunnen worden bepaald, bewijst de mededeeling van WORM MÜLLER en HAGEN [PFLÜGERS Archiv 33, 211 (1884)], dat bij laag suikergehalte van urine steeds 0,01 à 0,02 % suiker te veel wordt gevonden, »indem auch im normalen (zuckerfreien) Harne durch die Gährung eine kleine Menge reducirende Substanz, 0,01—0,02 % Traubenzucker entsprechend, verschwindet«. Latere onderzoekingen toonden aan, dat normale urine steeds 0,01—0,02 % glycose bevat!

[1]) Chemical News **39**, 77 (1879).

[2]) PFÜGERS Archiv **16**, 567 en 597 (1878).

[3]) Annalen der Chemie und Pharmacie **154**, 252 (1870).

[4]) l.c., p. 569.

WORM MÜLLER en HAGEN [1]) onderzochten nu met de methode van KNAPP orgaanextracten en urine van één diabeticus; in de extracten van spieren, longen en hersenen vonden zij wel reductie, maar geen suiker; in het leverextract en in de urine vonden zij naast glycose ook andere reduceerende stoffen (het aandeel, dat de glycose aan de reductie had, werd berekend door het suikergehalte polarimetrisch te bepalen). Zij besluiten hieruit, dat ook in het bloed waarschijnlijk andere reduceerende stoffen dan glycose voorkomen.

Ook CASENEUVE [2]) wees er op, dat de reductiemethode voor het bepalen van suiker in het bloed niet betrouwbaar kan zijn, omdat de polarimetrische bepaling er niet mee klopt.

OTTO [3]) was de eerste, die op een meer directe wijze tot het besluit kwam, dat het bloed naast glycose nog andere reduceerende stoffen bevat. In een groot aantal proeven bepaalde hij volgens KNAPP het reduceerend vermogen van bloed (door alcohol van eiwit bevrijd) vóór en na verwijdering der glycose door gisting. De uitslag was als volgt:

Bloed van:	Aantal proeven:	Reduceerend vermogen (in % glycose)	
		voor gisting:	na gisting:
Honden	14	0,127—0,205 %	0,016—0,058 %
Konijnen	10	0,106—0,140	0,017—0,031
Mensch	1	0,147	0,029

OTTO stelt ook reeds de vraag, van welken aard deze onvergistbare reduceerende stof is; hij veronderstelt, in

[1]) l.c., p. 600.
[2]) Comptes rendus de l'Acad. des Sc. **88**, 595 en 864 (1879).
[3]) PFLÜGERS Archiv **35**, 467 (1885).

navolging van WORM MÜLLER [1]), dat een gedeelte van de restreductie, evenals in urine, op kreatinine en acidum uricum berust.

Even vóór OTTO had ook SEEGEN [2]) gevonden, dat bij vergisting van de suiker uit bloed de verkregen hoeveelheid CO_2 slechts met ongeveer 75 % van de door reductie (volgens SOXHLET) bepaalde hoeveelheid suiker overeenkwam; en dat de vergiste bloedsuikeroplossing nog reduceerend op Fehling's proefvocht werkte. SEEGEN schreef dit echter — geheel willekeurig — aan onvolledigheid der gisting toe, en hield bij zijn bepalingen van het suikergehalte met deze restreductie geen rekening, — in overeenstemming met zijn reeds vroeger [3]) verdedigde opvatting, dat in het lichaam in 't geheel geen onvergistbare reduceerende stoffen voorkomen. *) Later heeft SEEGEN [4]) OTTO's proeven nog eens nagedaan; hij vindt dan, dat meestal wel overeenstemming bestaat tusschen de door reductie en de door gisting bepaalde hoeveelheid glycose, en houdt vol, dat in OTTO's proeven de gisting onvolledig moet zijn geweest, ten gevolge van stoffen, die de gisting remmen. Deze bewering van SEEGEN is echter geheel ongegrond; want OTTO [5]) had gevonden, dat glycose, aan het vergiste bloedextract toegevoegd, in 24-48 uren weer volledig

*) Ook VON MEHRING (l.c., p. 384) had de gisting als methode voor suikerbepaling in bloed veroordeeld: »Die Gährungsmethode, welche von GMELIN—TIEDEMANN, SCHMIDT, LECONTE und einigen Anderen benutzt wurde, eignet sich zu quantitativen Bestimmungen nicht, weil mit ihr viel weniger Zucker als mittelst Fehling'scher Lösung gefunden wird; sie ist deshalb verlassen worden«.

[1]) PFLÜGERS Archiv **27**, 90 (1882).
[2]) PFLÜGERS Archiv **34**, 388 (1884).
[3]) PFLÜGERS Archiv **22**, 239 (1880).
[4]) PFLÜGERS Archiv **37**, 369 (1885).
[5]) l.c., p. 497.

daaruit vergist wordt, aldus aantoonend, dat in zijn proeven geen remmende stoffen in het bloedextract voorkwamen.

De tegenstrijdigheid tusschen OTTO's en SEEGEN's uitkomsten is echter vrij gemakkelijk te verklaren; zij berust op de verschillen in de gebezigde reductie-methoden, die ik hierboven reeds even besprak. Volgens KNAPP bepaalt men ongeveer de totale hoeveelheid reduceerende stoffen. Volgens FEHLING-SOXHLET vindt men iets minder, daar bij die methode een deel van het koper-oxydule in oplossing blijft en door de lucht weer geoxydeerd wordt; het sterkst doet zich deze stoornis gelden, wanneer na verwijdering van de glycose door gisting geen of nagenoeg geen koper-oxydule meer neerslaat. Vandaar, dat OTTO (met KNAPP's vloeistof) vindt: aanzienlijke totale reductie, en wel restreductie; SEEGEN (volgens FEHLING-SOXHLET): geringere »totale« reductie, en meestal geen restreductie.

Later hebben zich nog ettelijke onderzoekers met het vraagstuk der restreductie beziggehouden. Zij pasten daarbij allerlei middelen toe om het bloed van eiwit te bevrijden; en gebruikten ook verschillende reductiemethoden: die van BERTRAND [1]), van TACHAU [2]), e. a., waarbij alleen het neergeslagen koper of kwik wordt bepaald, en daarnaast de methode van BANG [3]) en die van LEHMANN-MAQUENNE [4]), waarbij ook het in oplossing gebleven koper-oxydule meeberekend wordt. Het is dus niet te verwonderen, dat de uitkomsten dezer onder-

---

[1]) BERTRAND et THOMAS: Guide pour les manipulations de Chimie biologique, p. 85 (2me Ed. 1913).

[2]) Deutsches Arch. f. klin. Med. **102**, 597 (1911).

[3]) Bioch. Zeitschr. **2**, 271 (1907); **7**, 327 (1908).

[4]) MAQUENNE: Les Sucres et principaux Dérivés (Paris 1900), p. 281, alwaar verdere opgave van literatuur.

zoekers verschillen vertoonen, die niet geheel verklaarbaar zijn. In de onderstaande tabel wordt van de belangrijkste onderzoekingen een overzicht gegeven:

Onderzoeker:	Bloed van eiwit bevrijd door middel van:	Reductiemethode:	Restreductie gevonden:
Gürber [1].	$HCl + HgCl_2$ (Schenck)	Knapp	neen
Andersson [2].	alcohol	Bang	ja
Lyttkens en Sandgren [3]	koken met azijnzuur	Bang	ja
Rona en Takahashi [4]. .	Fe oxyd. dialysat.	Bertrand	neen
Frank en Bretschneider [5]	id.	Bertrand	neen
Takahashi [6].	id.	Bang	neen
	id.	Bertrand	neen
Schumm en Hegler [7]. .	?	Bang	ja
Griesbach en Straszner [8]	Fe oxyd. dialysat.	Maquenne	neen
	id.	Bertrand	neen
	id.	Tachau	neen

Uit de onderzoekingen van Otto, Andersson, Lyttkens en Sandgren, en Schumm en Hegler zou men kunnen besluiten, dat in het bloed onvergistbare reduceerende stoffen met zekerheid aangetoond kunnen worden, mits men een »gevoelige« reductiemethode gebruikt. Dit is ook wel de meening van de meeste schrijvers, die zich in de laatste jaren over het vraagstuk der restreductie hebben uitgelaten. Toch zijn er daarnaast anderen, die een minder positieve meening zijn toegedaan. Dat Takahashi volgens Bang, Griesbach en Straszner

[1] Gepubl. door Schenck: Pflügers Archiv **57**, 567 (1894).
[2] Bioch. Zeitschr. **12**, 1 (1908).
[3] Bioch. Zeitschr. **26**. 382 (1910); **31**, 153 (1911).
[4] Bioch. Zeitschr. **30**, 99 (1910).
[5] Zeitschr. f. physiol. Chemie **71**, 157 (1911).
[6] Bioch. Zeitschr. **37**, 30 (1911).
[7] Cit. Schumm, Zeitschr. f. physiol. Chemie **96**, 204 (1915).
[8] Zeitschr. f. physiol. Chemie **88**, 199 (1913).

volgens MAQUENNE na de gisting geen reduceerende stof meer vinden, is inderdaad in strijd met de overige uitkomsten met BANG's methode. GRIESBACH en STRASZNER [1]) achten de restreductie »lediglich ein Produkt der alten BANG'schen Methode, die — wie BANG selbst angibt — zu hohe Werte liefert«.

De vraag, of de volgens KNAPP en BANG gevonden restreductie een kunstproduct is, zal men het best kunnen beantwoorden door ook met andere gevoelige reductiemethoden het bloed te onderzoeken. Bij zulk een hernieuwd onderzoek zal men dan echter tegelijk ook met een geheel andere mogelijkheid rekening moeten houden, nl.: dat de restreductie wel eens op verontreinigingen of stofwisselingsproducten van de gebruikte gist zou kunnen berusten.

NEUBERG [2]), SALKOWSKI [3]), OPPLER [4]) en PAUL MAYER [5]) hebben er op gewezen, dat men, door de suikeroplossing uit bloed aan gisting te onderwerpen, een bron van fouten invoert. Zij vergistten zuivere glycose-oplossingen, en verwijderden de gist daarna door filtratie, of met behulp van phosphorwolfraamzuur of colloïdaal ijzerhydroxyde. In de vergiste suikeroplossing vonden zij dan in veel gevallen o. a.: optische activiteit, reductie van Fehlings proefvocht, positieve reacties op purinen en aminozuren, en soms ook een positieve orcinereactie. De gist, waarvan deze verontreinigingen afkomstig waren, was meestal gewone bakkersgist of persgist: dezelfde, die ook voor het onderzoek van de suiker van

---

[1]) l.c., p. 201.
[2]) Bioch. Zeitschr. **24**, 430 (1910).
[3]) Zeitschr. f. physiol. Chemie **69**, 466 (1910).
[4]) Zeitschr. f. physiol. Chemie **75**, 61 (1911).
[5]) Bioch. Zeitschr. **50**, 362 (1913).

het bloed gebruikt werd. MAYER vond, dat ook »Reinzuchthefe« de oplossing merkbaar met stofwisselingsproducten verontreinigde; hierbij moet echter opgemerkt worden, dat MAYER groote hoeveelheden gist aan de suikeroplossing toevoegde (op 150 cc. van een 0,1 % glycose-oplossing: 1,5 gram gist). Terecht merkt MAYER op, dat door deze feiten de waarde van veel onderzoekingen betreffende de z.g. »restreductie« van het bloed zeer twijfelachtig moet worden genoemd. Toch moet men uit deze waarnemingen niet besluiten, dat de gisting als hulpmiddel voor het bloedsuikeronderzoek geheel onbruikbaar zou zijn; zij geven slechts een aansporing, te trachten bij een hernieuwd onderzoek een zoo zuiver en zoo werkzaam mogelijke gistsoort te gebruiken, daarvan niet meer dan noodig is aan de te vergisten vloeistof toe te voegen, en ook dan nog steeds contrôle-bepalingen met de gist te doen.

Voor zoover ik heb kunnen nagaan, heeft alleen SCHUMM[1]) bij zijn onderzoek van het reduceerend vermogen van het vergiste bloed met dezen storenden invloed van de gist rekening gehouden. Wel gebruikte ook hij voor de gisting persgist; doch een preparaat, dat hij te voren in de centrifuge met een groote hoeveelheid water had uitgewasschen. Het reduceerend vermogen van het vergiste bloedextract (met colloïdaal ijzerhydroxyde van eiwit bevrijd) bepaalde hij volgens LEHMANN-MAQUENNE: steeds was een duidelijke restreductie aan te toonen (0,02—0,06%). Door de gist werd aan een glycose-oplossing wel reduceerende stof afgestaan, maar slechts zeer weinig: door 10 gram gist 0,5 à 2 mg. Hiermee heeft SCHUMM dus aangetoond:

---

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chemie **96**, 204 (1915).

1°. dat de restreductie niet uitsluitend een product is van BANG's methode;

2°. dat zij maar voor een uiterst klein gedeelte op stoffen, van de gist afkomstig, berust.

Welke zijn nu de onvergistbare reduceerende stoffen van het bloed?

Meestal worden stikstofhoudende stoffen voor de restreductie verantwoordelijk gesteld, daar van reduceerende stoffen als kreatine, kreatinine en acidum uricum de aanwezigheid in het bloed reeds lang bekend is. FEIGL[1]) schat het aandeel, dat deze stikstofhoudende stoffen in de restreductie van het bloed hebben, zelfs zoo groot, dat hij (onder den indruk van MAYER's kritiek op het gebruik van gist bij reductiebepalingen) voorstelt: het gehalte aan acidum uricum, kreatine en kreatinine van het bloed te bepalen, de reductie van deze 3 stoffen samen als restreductie in rekening te brengen naast de volgens BANG gevonden totale reductie, en zoo dus langs een grooten omweg tot het totale gehalte aan reduceerende suikers van het bloed te komen. Deze methode, die alleen door haar omslachtigheid al verre van nauwkeurig moet zijn, kan voor de suikerbepaling geen verbetering genoemd worden, daar zij nog minder dan de gistingsmethode antwoord geeft op de vraag: welke suikers of andere stikstofvrije stoffen zij bepaalt.

De vraag: of naast glycose nog andere vergistbare suikers voorkomen en of tot de restreductie ook suikers bijdragen, is alleen nader tot haar oplossing gebracht door die onderzoekers, die langs directen weg naar zulke suikers in het bloed hebben gezocht. Hierbij sluiten zich aan: de onderzoekingen ingesteld naar koolhydraten, die noch vergist-

---

1) Bioch. Zeitschr. **77**, 189 (1916).

baar noch reduceerend zijn, doch deze eigenschappen eerst na hydrolytische splitsing of losmaking uit hun verbindingen verkrijgen.

Van de onderzoekers, die bewezen hebben dat de naast glycose in het bloed voorkomende reduceerende stoffen voor een deel werkelijk *suikers* zijn, moeten als eersten HÉDON [1]) en vooral HANRIOT [2]) worden genoemd. Deze hebben n.l. uit groote hoeveelheden normaal paardenbloed de suiker zoo zuiver mogelijk afgescheiden door haar ten slotte eenige malen in alcohol op te lossen en door gefractionneerde praecipitatie met aether te reinigen. HANRIOT verkreeg de suiker zoo geheel vrij van stikstof, en nagenoeg vrij van asch. *) En ook van deze zuivere suiker bleek de rechtsdraaiing aanmerkelijk zwakker, de reductie daarentegen sterker te zijn dan van een overeenkomstige hoeveelheid glycose.

De koolhydraten, welker aanwezigheid in het normale bloed bewezen, waarschijnlijk gemaakt, of vermoed is, zijn in de volgende tabel in 3 groepen gerangschikt, naar hun vergistbaarheid en hun reduceerend vermogen:

		Vergistbaarheid:	Reduceerend vermogen:
I	Fructose	+	+
	Maltose	+	+
	Saccharose	+	—
II	Lactose	—	+
	Iso-maltose	—	+
	Pentosen	—	+
	Glycuronzuur	—	+
III	Dextrinen	—	—
	Glycogeen	—	—
	Gebonden suiker	—	—

*) Ook glycuronzure esters en ev. gevormde suikerlecithine-verbindingen moeten op deze wijze verwijderd zijn, daar deze oplosbaar zijn in aether.

[1]) Comptes rendus de la Soc. de Biol. **50**, 510 (1898).
[2]) Comptes rendus de la Soc. de Biol. **50**, 543 (1898).

Fructose. Volgens LÉPINE en BOULUD[1]) kan men soms in normaal hondenbloed fructose aantoonen*) op grond van de volgende reacties: reactie van SELIWANOFF; vermeerdering van het rechtsdraaiend en vermindering van het reduceerend vermogen na 2 uur verhitting tot 100° met 7 % HCl; uitkristalliseeren van fijne naalden van calciumfructosaat bij extractie met alcoholische azijnaether. NEUBERG en STRAUSS[2]) merken op, dat deze reacties voor het aantoonen van fructose te midden van andere suikers geheel onvoldoende zijn; vooral omdat de meeste dezer reacties ook voor andere keto-suikers gelden, en daarenboven fructose in alkalisch milieu gemakkelijk uit glycose kan ontstaan[3]). NEUBERG en STRAUSS gebruiken als herkenningsmiddel voor fructose: azijnzure methylphenylhydrazine, die slechts met fructose (en niet met glycose, mannose of chitosamine) een karakteristiek methylphenylosazon vormt (smeltpunt 158—160°). Bij hun proeven zorgen zij ervoor, dat de reactie der suikeroplossing voortdurend zwak zuur is. Op deze wijze kunnen zij bij 3 diabetes-lijders fructose in het bloed aantoonen ..... maar slechts dan, wanneer deze suiker te voren per os was toegediend. Verder vonden zij nog tot tweemaal toe fructose in het pleura-exsudaat van een patient met multiple lymphomen, zonder dat deze fructose gegeten had. In de overige gevallen had het zoeken naar fructose in lichaamsvloeistoffen steeds een negatief resultaat.

Saccharose. Een op saccharose gelijkende suiker zou

*) Later drukt LÉPINE zich voorzichtiger uit: »On pourrait aussi penser à la coexistence de lévulose«. [Le Diabète sucré, p. 60 (1909)]

1) Comptes rendus de l'Acad. des Sc. **133** *138*, (1901).

2) Zeitschr. f. physiol. Chemie **36**, 227 (1902).

3) Zie: LOBRY DE BRUYN en ALBARDA VAN EKENSTEIN, Recueil des Travaux chimiques des Pays-Bas **14**, 156 en 203 (1895).

volgens LÉPINE[1]) soms in hondenbloed aantoonbaar zijn. LÉPINE's argument hiervoor (reduceerend vermogen van het bloedextract geringer dan het rechtsdraaiend vermogen) is echter al heel zwak, daar ook maltose en vele polysacchariden sterk rechtsdraaiend zijn.

Maltose. Met het zoeken naar maltose hebben zich meer onderzoekers beziggehouden. Terwijl door sommigen het voorkomen van maltose in het bloed alleen nog maar op losse gronden vermoed werd (proeven van COUVREUR[2]) met konijnenbloed: toeneming van de reductie door koken met zuur), gingen LÉPINE en BOULUD[3]) op een meer nauwkeurige wijze te werk. Zij achtten de aanwezigheid van maltose eerst dan waarschijnlijk, wanneer de zuurhydrolyse het rechtsdraaiend vermogen van het bloedextract deed dalen en het reduceerend vermogen stijgen. Bij sommige lijders aan diabetes en bij pancreaslooze honden konden zij dit waarnemen. Daar echter de gevonden verschillen slechts gering waren, en bovendien ook op de aanwezigheid van polysacchariden zouden kunnen berusten, hebben LÉPINE en BOULUD ook getracht bij hun proefdieren de maltose meer rechtstreeks aan te toonen. Na verhitting van de suikers uit het bloed met phenylhydrazine konden zij uit het verkregen osazonmengsel een gedeelte der kristallen in aether oplossen, en dit gedeelte door de bepaling van het smeltpunt als maltosazon herkennen, — terwijl zuiver glycosazon in aether volkomen onoplosbaar bleek. Voor het smeltpunt van het »maltosazon« vonden zij bij de bepaling volgens BERTRAND (»fusion instantanée au bloc MAQUENNE«)

---

[1]) Le Diabète sucré, p. 60 (1909).

[2]) Annales de la Soc. linnéenne de Lyon **45**, 73 (1898).

[3]) Comptes rendus de l'Acad. des Sc. **132**, 611 (1901); **133**, 138 (1901). En: Comptes rendus de la Soc. de Biol. **53**, 1062 (1901).

198°, bij bepaling volgens EMIL FISCHER (snelle verhitting in glycerine-bad) 205—206°; dus precies als van zuiver bereid maltosazon. Later heeft LÉPINE [1]) op dezelfde wijze dikwijls maltose kunnen aantoonen in het bloed van gezonde honden, zelfs na vleeschvoeding; en in 1911 schrijft hij: »il existe très souvent dans le sang du maltose«. [2]) — Hoe voorzichtig men bij het determineeren van suikers met zijn conclusies moet zijn, zelfs wanneer een onderzoeker als LÉPINE daarvoor een zoo betrouwbare methode als de phenylhydrazine-reactie gebruikt, wordt door BIERRY [3]) scherp in het licht gesteld. BIERRY wilde LÉPINE's proeven nadoen, maar begon met de oplosbaarheid der osazonen te controleeren en vond ..... dat maltosazon even onoplosbaar in aether is als glycosazon. LÉPINE [4]) moet dit toegeven. Het is dus zeker, dat LÉPINE in den aether niet maltosazon, maar het osazon van een andere in het bloed voorkomende suiker opgelost had; en het bestaan van maltose in het bloed is weer even onbewezen als te voren.

Lactose. Over het voorkomen van melksuiker in het normale bloed bevat de literatuur geen enkele mededeeling. Voor zoover ik heb kunnen nagaan is zelfs in het bloed van kraamvrouwen nooit lactose aangetoond, ofschoon de in het puerperium als regel voorkomende lactosurie de aanwezigheid van lactose in het bloed wel doet veronderstellen. — Belangwekkend zijn de onderzoekingen van RÖHMANN en KUMAGAI [5]), waaruit blijkt, dat na intraveneuse injectie van rietsuiker het serum van

---

1) Le Diabète sucré, p. 61 (1909).
2) Revue scientifique **49**, 641 (1911).
3) Comptes rendus de la Soc. de Biol. **73**, 453 (1912).
4) Comptes rendus de la Soc. de Biol **73**, 589 (1912).
5) Bioch. Zeitschr. **61**, 464 (1914); **72**, 26 (1915).

konijnen en honden het vermogen krijgt, buiten het lichaam rietsuiker, fructose en glycose in lactose om te zetten. Later vond RÖHMANN [1]), dat ook bij mannelijke konijnen dit melksuikervormende enzym door parenteralen rietsuikertoevoer »hervorgelockt« kan worden; en dat dit enzym gemakkelijk aangetoond kan worden in het borstklierweefsel eener normale koe.

Iso-maltose. PAVY en SIAU [2]) onderzochten het alcoholisch extract van een liter paardenbloed, dat na indamping (eerst bij 40° onder verlaagden druk, daarna op het kokende waterbad) gezuiverd was door koken met aluin en nabehandeling met basisch loodacetaat en H_2S, en ten slotte tot 50 cc ingedampt. Reductie-bepalingen voor en na koken met H Cl gaven als uitkomst voor het suikergehalte van het bloed resp. 0,116 % en 0,155 %; de stijging van het reduceerend vermogen kon niet op glycogeen of dextrine berusten (daar deze stoffen door den alcohol verwijderd moeten zijn); daarom vermoedden PAVY en SIAU de aanwezigheid van een ander hydrolyseerbaar koolhydraat. Uit de rest van het bloedextract verkregen zij door verhitting met azijnzure phenylhydrazine naast glycosazon (smeltpunt 203°) een geheel ander osazon: bestaande uit spherische aggregaten van fijne naalden, oplosbaar in warm water, na herhaald omkristalliseeren smeltend bij *157—158°*. PAVY en SIAU houden op grond hiervan deze tweede suiker uit het bloed voor »iso-maltose«. Opgemerkt moet echter worden, dat iso-maltosazon volgens EMIL FISCHER [3]) bij *150—153°* smelt; en dat de iso-maltose, door KÜLZ en VOGEL [4]) bij

---

[1]) Bioch. Zeitschr. **84**, 382 (1917).
[2]) Journal of Physiology **26**, 282 (1901).
[3]) Untersuchungen über Kohlenhydrate u. Fermente, p. 666 (1909).
[4]) Zeitschr. f. Biologie **31**, 108 (1895).

onderzoek van de splitsingsproducten van glycogeen en amylum, en door LEMAIRE [1]) bij onderzoek van de suikers der normale urine van den mensch gevonden, een osazon vormt met smeltpunt *150—151°*. Het is dus waarschijnlijk, dat het door PAVY en SIAU verkregen osazon: òf een mengsel was van iso-maltosazon en een osazon van hooger smeltpunt, òf een osazon van een andere suiker dan iso-maltose *). — Latere mededeelingen omtrent een uit bloed te bereiden phenylosazon, met smeltpunt onder 160°, zijn niet verschenen.

Pentosen. LÉPINE en BOULUD [2]) besluiten tot de aanwezigheid van pentosen in hondenbloed op grond van de volgende gegevens: 1°: weinig gisting en geringe rechtsdraaiing bij sterke reductie; 2°: karakteristieke absorptie-banden in het spectrum bij de orcine- en phloroglucine-reactie; 3°: destillatie van furfurol na langdurige verhitting met zoutzuur; 4°: vorming van een parabroom-phenylhydrazon, dat in pyridine-alcohol opgelost zwak rechtsdraaiend is. Door dit onder 4° genoemde feit hebben LÉPINE en BOULUD een verwisseling met glycuronzuur kunnen uitsluiten, en de aanwezigheid eener

*) Sommige pentosen, o.a. arabinose en xylose, vormen een osazon, dat bij ± 158° smelt. — PAUL MAYER [Zeitschr. f. physiol. Chemie **32**, 518 (1901)] vermoedt, dat in de proef van PAVY en SIAU een verwisseling met glycuronzuur in 't spel is. Dit lijkt mij echter niet waarschijnlijk; het is wel waar, dat de aanwezigheid van veel gepaard glycuronzuur in het paardenbloed de sterke stijging der reductie door koken met HCl verklaren zou; maar de phenylhydrazine-verbinding van glycuronzuur, met smeltpunt 159—164°, die bij bepaalde concentraties ontstaan kan, is onbestendig en vertoont na omkristalliseeren groote veranderingen in smeltpunt.

1) Over het Voorkomen van Koolhydraten in de Urine van den gezonden Mensch en over Lactosurie bij Kraamvrouwen. Diss. Utrecht, p. 38 en 44 (1895).

2) Comptes rendus de l'Acad. des Sc. **133**, 138 (1901).

pentose dus zeer waarschijnlijk gemaakt. Het is te betreuren, dat zij over de oplosbaarheid van hun p-Br-phenylhydrazon in water en alcohol niets meedeelen, en dat zij geen smeltpunt- of stikstofbepaling ervan hebben verricht; wij zijn nu geheel in het onzekere, welke pentose het is (arabinose? xylose? methylpentose? samengestelde pentose?). — ANDERSSON [1]) heeft, toen hij in konijnenbloed na gisting nog 0,03—0,12 % *) reduceerende stof gevonden had, ook den aard dezer »Restzucker« nader onderzocht; hij vond, dat het vergiste konijnenbloed steeds een positieve orcine-reactie geeft, en kon in de meeste gevallen een phenylosazon eruit afscheiden, dat oplosbaar was in warm water. Hoewel deze gegevens ieder op zichzelf niets bewijzen, deed hun combinatie hem aan het voorkomen eener pentose in het bloed denken. Ook deze onderzoeker had niet genoeg osazon voor een smeltpuntbepaling.

Glycuronzuur. Om verschillende redenen was het voor het onderzoek der suikers in bloed van groot belang, uit te maken of glycuronzuur in het bloed voorkomt. Deze stof toch, die van glycose slechts verschilt, doordat de CH_2OH-groep tot een carboxylgroep is geoxydeerd, heeft nog reductie-vermogen, doch wordt door gist niet aangetast; met allerlei stoffen vormt glycuronzuur esters, die linksdraaiend zijn, en waarvan sommige [2]) Fehling's proefvocht direct reduceeren, andere eerst na hydrolyse door koken met verdund zuur; door zijn verwantschap

*) In normaal konijnenbloed vond ANDERSSON 0,03—0,04 % onvergistbare reduceerende stof. Hij vond bij de hyperglycaemie na sterk bloedverlies de restreductie ongeveer in dezelfde mate gestegen als de glycose.

[1]) Bioch. Zeitschr. **12**, 7 (1908).

[2]) Zie: LÉPINE, Journal de Physiol. et de Pathol. gén. **7**, 775 (1905).

met de pentosen (glycuronzuur = pentose-carbonzuur) geeft glycuronzuur ook kleurreacties met phloroglucine, orcine, enz., die sterk op die van de pentosen gelijken; met azijnzure phenylhydrazine vormt het, al naar de concentraties, verschillende verbindingen van onbekende samenstelling, die voor het herkennen van glycuronzuur niet te gebruiken zijn, maar in zooverre van beteekenis zijn, dat het smeltpunt van de ééne (159—164°) dicht bij dat van pentosazon, en het smeltpunt van de andere (199—205°) dicht bij dat van verscheiden hexosazonen ligt. Het meest betrouwbare reagens op glycuronzuur is volgens NEUBERG [1]): parabroomphenylhydrazine; daarmee vormt glycuronzuur een hydrazon, dat zich door zijn onoplosbaarheid in absoluten alcohol, zijn hooge smeltpunt (230°) en zijn sterke linksdraaiing ($[\alpha]_D = -369°$) van de p-Br-phenylhydrazonen van alle hexosen en pentosen onderscheidt. Volgens deze reactie kon PAUL MAYER [2]) aantoonen, dat in normaal runderbloed glycuronzuur steeds voorkomt; en wel: in gepaarden vorm, daar na gisting het bloedextract linksdraaiend was, en eerst na zwavelzuur-hydrolyse rechtsdraaiing werd waargenomen en het voor glycuronzuur karakteristieke hydrazon kon worden verkregen. Een stikstofbepaling bevestigde nog eens ten overvloede, dat ook geen hydrazon van een disaccharide in 't spel kon zijn. LÉPINE en BOULUD [3]) vonden op dezelfde wijze glycuronzuurverbindingen in hondenbloed. MOREL en FRAISSE [4]) daarentegen kregen in even nauwkeurige onderzoekingen in hondenbloed

---

[1]) Ber. d. deutschen chem. Ges. **32**, 2395 (1899).

[2]) Zeitschr. f. physiol. Chemie **32**, 518 (1901).

[3]) Comptes rendus de l'Acad. des Sc. **133**, 138 (1901).

[4]) Bulletin de la Soc. chimique de France, 4me série, tome I, p. 659 et 1043 (1907).

tot 6 maal toe negatieve glycuronzuur-reacties. Met de reactie van TOLLENS[1]) (met naphthoresorcine) konden zoowel LYTTKENS en SANDGREN[2]) als FRANK en BRETSCHNEIDER[3]) glycuronzuur aantoonen in konijnenserum. In menschenbloed zijn glycuronzuurverbindingen nooit met zekerheid aangetoond. MAYER meent, dat men zijn met runderbloed verkregen resultaat wel zonder meer op menschenbloed zal mogen overdragen, daar ook menschenbloed na gisting linksdraaiing en reductie en een positieve orcine-reactie vertoont; in menschenurine komt glycuronzuur steeds voor. — Bij elk bloedonderzoek, waarbij men op grond van: reductie na gisting, of linksdraaiing, of toeneming van rechtsdraaiing en van reductie na zuurhydrolyse, of positieve orcine-reactie, of osazononderzoek, tot de aanwezigheid eener andere suiker dan glycose meent te moeten besluiten, zal men dus met de mogelijkheid eener verwisseling met gepaard glycuronzuur moeten rekening houden.

Dextrinen. MAGENDIE[4]) vond reeds in 1846 in het bloed van met koolhydraten gevoede honden en paarden een in water oplosbaar, in alcohol onoplosbaar koolhydraat, dat de eigenschappen van dextrine vertoonde. Eenige jaren later nam FIGUIER[5]) waar, dat bij honden in het bloed der v. portae en in het periphere bloed zich een reduceerende stof bevond, die onvergistbaar was, en eerst na 15 minuten koken met verdund H_2SO_4 in een vergistbare suiker overging. SANSON[6]) vond in verschillende organen en ook in het bloed der v. portae en der v.

[1]) Ber. d. deutschen chem. Ges. **41**, 1788 (1908).
[2]) Bioch. Zeitschr. **26**, 382 (1910).
[3]) Zeitschr. f. physiol. Chemie **76**, 226 (1912).
[4]) Comptes rendus de l'Acad. des Sc. **23**, 192 (1846).
[5]) Comptes rendus de l'Acad. des Sc. **45**, 133 (1857).
[6]) Comptes rendus de l'Acad. des Sc. **44**, 1323 (1857); **45**, 344 (1857).

jugularis na koolhydraatvoeding: dextrine, die hij door diastase in reduceerende suiker zag veranderen; hetzelfde kon ook NAUNYN[1]) waarnemen. En FRANK en BRETSCHNEIDER[2]) deelen mee, dat in de bloedlichaampjes zoowel als in het serum van konijnenbloed een stof voorkomt, die door hydrolyse met H Cl reduceerend vermogen krijgt en volledig vergistbaar wordt; glycogeen kon dit niet zijn, daar het bloed hiervan slechts geringe sporen bevat. Deze onderzoekingen wijzen erop, dat — althans na voeding met koolhydraten — in het bloed dextrinen voorkomen. BANG[3]) heeft reden te veronderstellen, dat de dextrinen door zijn reductie-methode mee bepaald worden. — Tot de dextrinen worden ook wel gerekend: gommen en gomachtige stoffen, die zich van de eigenlijke dextrinen onderscheiden, doordat zij veel moeilijker door zuren gehydrolyseerd worden, of doordat zij bij de hydrolytische splitsing andere suikers dan glycose leveren. Op dezelfde wijze als LANDWEHR[4]) zijn »dierlijke gom« afscheidde uit verschillende organen en uit urine, gelukte het aan E. FREUND[5]) uit runderbloed een stof met dezelfde eigenschappen te bereiden. Deze gom uit het bloed had de samenstelling $(C_6H_{10}O_5)_x$; zij gaf eerst na 30 minuten koken met H Cl merkbare reductie van Fehling's proefvocht; de bij de hydrolyse ontstane suiker was niet vergistbaar: in deze eigenschap stemt de gom van het bloed dus met die van de urine overeen.

Glycogeen. Volgens de onderzoekingen van HUPPERT[6])

---

[1]) Arch. f. exper. Pathol. u. Pharmakol. **3**, 92 (1874).
[2]) Zeitschr. f. physiol. Chemie **76**, 226 (1912).
[3]) Der Blutzucker, p. 39 (1912).
[4]) Zeitschr. f. physiol. Chemie **8**, 122 (1884). En: Centralbl. f. d. med. Wiss. (**1885**), p. 369.
[5]) Centralbl. für Physiologie **6**, 345 (1892).
[6]) Zeitschr. f. physiol. Chemie **18**, 144 (1894).

is glycogeen steeds in het normale bloed aanwezig, maar slechts in een hoeveelheid van ± 1 m.g. per 100 c c, en voornamelijk in de leucocyten. Meestal wordt geen glycogeen in het bloed gevonden, daar het bij de meeste methoden neergeslagen wordt met het eiwitstolsel. Bij de methode van HUPPERT, waarbij een zeer fijn-korrelig stolsel ontstaat, kan men het van gom bevrijde glycogeen door de jodium-reactie aantoonen, en door polarisatie voor en na hydrolyse bepalen.

Gebonden suiker.

In een uitgebreid onderzoek heeft PAVY [1]) aangetoond, dat uit verschillende eiwitstoffen (o. a. ovalbumine, eiwit-stoffen van het bloedserum, fibrine en plantaardige eiwitstoffen) door hydrolyse met verdund zwavelzuur een reduceerende stof kan worden verkregen, die zich door haar eigenschappen als een suiker kenmerkt. Door koken van een groote hoeveelheid ovalbumine met KOH verkreeg Pavy een gomachtige stof, waaruit hij door hydrolyse met H_2SO_4 eveneens de suiker kon bereiden. De suiker vormde met phenylhydrazine een osazon, dat in kristalvorm soms wel op glycosazon geleek, maar een smeltpunt van 189—190° vertoonde en daarin dus met galactosazon overeenkwam. De suiker was onvergistbaar en optisch inactief, dus niet identiek met glycose; zij kwam in eigenschappen het meest met LANDWEHR'S »gummose« overeen. — Later heeft WEISS [2]) PAVY's uit-komsten kunnen bevestigen en aanvullen. De »gom« uit ovalbumine kon WEISS niet volkomen vrij van stikstof krijgen. De door hydrolyse ontstane suiker (geheel vrij van stikstof) vormde een in warm water *on*oplosbaar osazon met smeltpunt 179—191°. Door haar eigenschappen

[1]) The Physiology of the Carbohydrates, p. 27—57 (1894).
[2]) Centralblatt für Physiologie **12**, 515 (1898).

en door de elementair-analyse van het osazon deed de suiker zich aan WEISS kennen als een methylpentose: $C_6H_{12}O_5$, een isomeer van rhamnose dus.

Daar PAVY ook uit de gezamenlijke eiwitstoffen van het bloed door hydrolyse een suiker had kunnen bereiden, was dus vastgesteld, dat in het bloed suiker, aan eiwit gebonden, voorkomt. Later hebben verschillende onderzoekers de afzonderlijke eiwitstoffen van het bloed onderzocht; en zoowel in serumglobuline en serumalbumine als in fibrine werd een suiker gevonden, die door de meeste onderzoekers voor d-glycosamine wordt gehouden De hoeveelheid dezer suiker was echter zeer gering; en daar zelfs bij het zuiveren van eiwit door kristallisatie een verontreiniging met andere eiwitstoffen of met koolhydraten niet uit te sluiten is, betwijfelt HAMMARSTEN[1]), of de gevonden suiker wel tot de eiwitmoleculen zelf behoort.

Volgens BYWATERS[2]) komt in het bloed een glycoproteïde (»seromucoide«) voor, en wel in een hoeveelheid van 0,5—1 % van de gezamenlijke eiwitstoffen van het bloed; de daaraan gebonden suiker zou ongeveer 10 % bedragen van de hoeveelheid vrije glycose van het bloed. Waarschijnlijk zijn deze waarden veel te hoog, daar de wijze, waarop BYWATERS de mucoide stof uit het bloedserum afscheidde, reden geeft te veronderstellen, dat de stof met polysacchariden verontreinigd was. —

Ook Fransche onderzoekers kwamen tot het besluit, dat in het bloed suiker in gebonden vorm voorkomt: In 1891 deden LÉPINE en BARRAL[3]) een merkwaardige

---

[1]) Lehrbuch der physiol. Chemie, p. 84 (7. Aufl. 1910).

[2]) Journal of Physiology **35**: Proc. of the physiol. Society p. III (Oct. 20, 1906).

[3]) Comptes rendus de l'Acad. des Sc. **112**, 1414 (1891).

ontdekking: indien zij de glycolyse in hondenbloed hadden opgeheven door verhitting van het bloed tot 58°, vonden zij na 15—30 minuten het suikergehalte merkbaar gestegen (10—20 % van de oorspronkelijke reductie, volgens BERTRAND bepaald). In 1903 vonden LÉPINE en BOULUD [1]), dat deze vrijwording van suiker ook in het stroomende bloed plaats heeft. LÉPINE en BARRAL meenden oorspronkelijk, dat de vermeerdering van het suikergehalte moest worden toegeschreven aan de transformatie van glycogeen in glycose. Later, toen gebleken was dat de hoeveelheid glycogeen van het bloed daarvoor lang niet voldoende was, kwam LÉPINE tot de veronderstelling, dat de suiker voor een aanzienlijk gedeelte in lossere of vastere verbindingen in het bloed voorkomt, en voerde hij het begrip »sucre virtuel« in, waaronder hij verstaat: de suiker die »devient identique au glycose dès qu'il est dégagé de la combinaison, où il est dissimulé aux agents réducteurs«. Onder »sucre virtuel« verstaat LÉPINE dus: de gebonden *glycose* van het bloed; en op deze gebonden glycose zou, althans voor een groot gedeelte, de spontane stijging van het reduceerend vermogen van het bloed berusten. Een strikt bewijs hiervoor geeft LÉPINE echter niet: hij onderzoekt niet nader, in hoeverre deze spontane stijging op glycuronzuur of op polysacchariden of op andere suikers dan glycose berust. Wel heeft hij later verschillende middelen toegepast, die in veel grootere mate den overgang van »sucre virtuel« in »sucre immédiat« doen plaats hebben. Zoo vonden LÉPINE en BOULUD, dat het reduceerend vermogen van het van eiwit bevrijde bloed sterker toeneemt na verhitting met allerlei verdunde zuren [2]), en

[1]) Comptes rendus de l'Acad. des Sc. **137**, 475 en 686 (1903).
[2]) Journal de Physiol. et de Pathol. gén. **7**, 775 (1905).

van het gedefibrineerde bloed door de werking van emulsine en vooral invertine [1]); en dat in het bloed het allerhoogste suikergehalte gevonden wordt, indien het coagulum (gevormde elementen + eiwitstoffen) 24—32 uur met 5 % fluorwaterstofzuur tot 100 ° is verhit (waarna het opgeloste eiwit door kwiknitraat wordt neergeslagen): het suikergehalte van het totale bloed stijgt dan soms tot het dubbele of nog hooger. [2]) — Moet het voor de spontane stijging der reductie al onbewezen genoemd worden, dat zij voor het grootste gedeelte op losmaking van glycose uit verbindingen berust, — van de door het koken met sterke zuren vrij wordende reduceerende stoffen is wel met zekerheid te zeggen, dat ook gom, glycogeen, en vooral glycuronzuurverbindingen er toe bijdragen. Door de tegenstanders van LÉPINE's opvatting, dat de »sucre virtuel« voor de koolhydraatstofwisseling zulk een groote beteekenis zou hebben, is hem dan ook herhaaldelijk verweten, dat de proeven, waarbij het bloed met H F gekookt werd, noch voor het bestaan van gebonden glycose, noch voor het vrijworden van dergelijke groote hoeveelheden reduceerende stof in het stroomende bloed als bewijs kunnen dienen. [3])

In de laatste jaren heeft LÉPINE [4]) van de »sucre virtuel« ook een minder scherpe definitie gegeven: »Ce que nous appelons sucre virtuel n'est qu'un ensemble hétérogène de combinaisons de glycose et peut-être, pour une petite part, d'autres matières sucrées«. Welke suikers dit zijn, en in welke verbindingen zij in het bloed voorkomen, — deze vragen vindt men in LÉPINE's werken niet bevredi-

[1]) Comptes rendus de l'Acad. des Sc. **144**, 1014 (1907).
[2]) Journal de Physiol. et de Pathol. gén. **13**, 178 (1911).
[3]) Zie o.a. E. FRANK. Zeitschr. f. physiol. Chemie **70**, 129 (1911).
[4]) Revue scientifique **49**, 641 (1911).

gend beantwoord; slechts het vermoeden wordt uitgesproken, dat o.a. glycosiden en glycuronzure esters en enkele hydrolyseerbare suikers tot de »sucre virtuel« bijdragen. Het begrip »sucre virtuel« is hierdoor zeer vaag geworden.

BIERRY en LUCIE FANDARD [1]) namen ook waar, dat door verhitting met zuren het reduceerend vermogen van het bloed van honden, paarden en vogels stijgt; het verschil tusschen »sucre libre« en »sucre total« noemen zij »sucre combiné«. Bij onderzoek van de gebonden suiker van het serum vinden zij: d-glycose en een geringe hoeveelheid glycosamine. [2]) BIERRY en RANC [3]) hebben ook de stof, waaraan de glycose gebonden is, opgespoord; zij namen waar, dat na verwijdering van het eiwit uit het bloed (door verwarming, alcohol of kwiknitraat) het reduceerend vermogen door koken met zuren niet meer toeneemt, en besluiten hieruit, dat in het bloed geen glycosiden, dextrinen, hydrolyseerbare suikers of glycuronzuurverbindingen voorkomen, en dat de »sucre combiné« dus deel uitmaakt van de eiwitmoleculen; zij spreken in het vervolg van »sucre protéidique«. In overeenstemming hiermee vinden zij verband tusschen het eiwitgehalte en de hoeveelheid gebonden suiker van het bloed: het veneuse bloed b.v. overtreft het arteriëele zoowel in gehalte aan eiwitstoffen als in gehalte aan gebonden suiker. Na zorgvuldige zuivering geven zoowel serumglobuline en serumalbumine als fibrinogeen na hydrolyse met een zuur: vrije glycose. Latere proeven doen BIERRY en RANC veronderstellen, dat ook minder samengestelde moleculen, als die der polypeptiden van het bloed, suiker bevatten.

---

[1]) Comptes rendus de la Soc. de Biol. **72**, 928 (1912).
[2]) Comptes rendus de l'Acad. des Sc. **158**, 61 (1914).
[3]) Comptes rendus de l'Acad. des Sc. **158**, 278 (1914).

BIERRY's waarneming, dat het bloed na verwijdering der eiwitstoffen geen stoffen meer bevat, die door hydrolyse sterker reduceerend kunnen worden, is geheel in strijd met de vroeger meegedeelde bevindingen van PAVY [1]), COUVREUR [2]), MAYER [3]), LÉPINE en BOULUD [4]), FRANK en BRETSCHNEIDER [5]) e. a., die na de verwijdering van de eiwitstoffen het reduceerend vermogen van de bloedsuikeroplossing door koken met zuren nog aanmerkelijk zagen stijgen.

BIERRY en FANDARD [6]) hebben ook volgens de methode, door LÉPINE aangegeven, getracht de spontane vrijwording van »sucre virtuel« te constateeren, maar steeds met negatief resultaat; ook door invertine en emulsine vonden zij geen spoor van suikervorming. BIERRY betwijfelt daarom de betrouwbaarheid van LÉPINE's onderzoekingen [7]). LÉPINE [8]) antwoordt hierop, dat de negatieve uitkomsten van BIERRY en FANDARD van weinig waarde zijn tegenover de vele positieve van hemzelf; en dat hij (LÉPINE) ook nooit beweerd heeft, dat de spontane stijging van het suikergehalte van het bloed bij *alle* honden wordt waargenomen. Men kan zich echter bij het volgen van dezen strijd tusschen LÉPINE en BIERRY moeilijk aan de neiging onttrekken, LÉPINE's standpunt steeds zwakker te gaan vinden. Want niet alleen zijn de verschillen, die de spontane vrijwording van »sucre virtuel« moeten

---

[1]) Journal of Physiology **24**, 479 (1899); **26**, 282 (1901).
[2]) Ann. de la Soc. linnéenne de Lyon **45**, 73 (1898).
[3]) Zeitschr. f. physiol. Chemie **32**, 518 (1901).
[4]) Journal de Physiol. et de Pathol. gén. **7**, 775 (1905).
[5]) Zeitschr. f. physiol. Chemie **76**, 226 (1912).
[6]) Comptes rendus de la Soc. de Biol. **73**, 454 (1912).
[7]) Ook: BIERRY en FANDARD, Comptes r. de l'Acad. des Sc. **158**, 516 (1914).
[8]) Comptes rendus de la Soc. de Biol. **73**, 591 (1912).

aantoonen, in LÉPINE's latere onderzoekingen aanmerkelijk kleiner dan in de eerste; maar bovendien deelt LÉPINE in een zijner laatste publicaties mee [1]), dat in het bloed van nieuwe, gezonde honden in de meeste gevallen weinig of in 't geheel geen suiker vrij werd, en dat de spontane ontwikkeling van suiker met zekerheid slechts kan worden verwacht bij proefdieren met ernstige stoornissen in de stofwisseling (b.v. door een groot aantal voorafgegane aderlatingen of sterk bloedverlies, of door intraveneuse injectie van amylase, pancreatine, pancreas- of leverextract, phloridzine of glycose).

Deze laatste mededeeling van LÉPINE werpt een geheel ander licht op de beteekenis van zijn »sucre virtuel« voor de normale stofwisseling. Zij brengt de proeven van OTTO [2]) en van ANDERSSON [3]) in herinnering, die bij honden en konijnen na sterk bloedverlies de restreductie van het bloed toegenomen vonden. — Vooral de onderzoekingen van J. LOEWY [4]) verdienen in verband met den strijd tusschen LÉPINE en BIERRY alle aandacht. LOEWY verhitte bloedserum tot 58° en onderzocht den invloed hiervan op het reduceerend vermogen; bij acute infectieziekten vond hij na het inactiveeren het reduceerend vermogen van het bloedserum sterk gestegen; bij lijders aan chronische ziekten en bij gezonden was het bloedsuikergehalte hetzelfde gebleven of gedaald. Na intraveneuse injectie van allerlei eiwitstoffen zag LOEWY hyperglycaemie ontstaan [5]). Deze en nog andere waarnemingen voeren LOEWY tot de veronderstelling, dat in het bloed-

---

[1]) LÉPINE en BOULUD, Comptes r. de la. Soc. de Biol. **74**, 76 (1913).
[2]) PFLÜGERS Archiv **35**, 467 (1885).
[3]) Bioch. Zeitschr. **12**, 1 (1908).
[4]) Deutsches Arch. f. klin. Medizin **121**, 156 (1916).
[5]) l.c., p. 150.

serum verbindingen, door een gemakkelijk omkeerbare reactie uit suikers en eiwitstoffen ontstaan, voorkomen, en dat de suiker van het bloed ook deze biologische beteekenis heeft: dat zij door het lichaam tot binding van eiwitstoffen (b.v. toxinen) gebruikt wordt *). Ik wil hier over LOEWY's belangrijke onderzoekingen niet in bijzonderheden uitweiden; ik heb ze slechts aangehaald, om er op te wijzen, van hoeveel belang het is, de proefdieren in geheel normalen toestand te onderzoeken; het is toch niet onmogelijk, dat bij LÉPINE's meeste honden, die reeds herhaaldelijk een sterk bloedverlies hadden geleden, de aanvulling van het tekort aan eiwitstoffen en suikers in het bloed tot een overcompensatie geleid heeft, en zoo tot vorming van »sucre protéidique«, die zoo los gebonden is, dat reeds verhitting van het bloed tot 58° voldoende is om een gedeelte dier suikereiwitverbindingen uiteen te doen vallen.

De in dit overzicht besproken literatuur leert dus, dat glycose en nog andere reduceerende stoffen in het normale bloed voorkomen, en dat tot de restreductie, behalve stikstofhoudende stoffen, ook koolhydraten en

*) In overeenstemming hiermee is het feit, dat bij ziekten, die met koorts gepaard gaan, door sommigen voor het directreduceerend vermogen van het bloed hooge waarden, door anderen daarentegen normale of ook wel sterk wisselende waarden worden gevonden. En zeer belangwekkend is in dit verband de waarneming van DE LANGEN en SCHUT [Geneesk. Tijdschr. v. Ned. Indië **57**, 260 (1917)]: dat vóór den koortsaanval bij malaria het bloedsuikergehalte (bepaald volgens de micromethode van BANG) een stijging vertoont, die tijdens de koorts weer spoedig verdwijnt. Wanneer men bij dergelijke klinische onderzoekingen behalve de totale reductie ook de restreductie en de gebonden suiker van het bloed kon bepalen, zou men misschien tot interessante gevolgtrekkingen op het gebied der serologie kunnen komen.

glycuronzuur bijdragen. Met zekerheid zijn in het normale bloed de volgende koolhydraten naast glycose aangetoond: een pentose, glycuronzuurverbindingen, glycogeen, een gomachtige stof, en aan eiwit gebonden suiker. De aanwezigheid van dextrinen in het bloed is wel waarschijnlijk; doch de mogelijkheid van een verwisseling met glycuronzuurverbindingen, of met eiwit-suiker, of met dextrinen, van de koolhydraten van het voedsel afkomstig, is in de daaromtrent meegedeelde proeven niet uit te sluiten. De bewijzen voor het voorkomen van fructose, maltose, saccharose en iso-maltose in het bloed zijn onvoldoende. Na hetgeen LÉPINE zelf in zijn laatste mededeeling over de »sucre virtuel« zegt, moet vermoed worden, dat in het normale bloed spontaan geen gebonden suiker vrij wordt, en dat daarin de »sucre virtuel« zich bepaalt tot die polysacchariden, hydrolyseerbare suikers en verbindingen van suiker met eiwit, die in vitro eerst door enzymen of door koken met zuren worden gesplitst.

Veel waarnemingen betreffende de in het bloed voorkomende koolhydraten zijn met elkaar in strijd. De oorzaak hiervan is voornamelijk te zoeken in het feit, dat voor de reductie-bepaling door de verschillende onderzoekers verschillende methoden worden gebezigd; en dat de onderzoekers, die terecht aan de methoden, welke de totale hoeveelheid reduceerende stof bepalen, de voorkeur geven, meestal achterwege laten nader te onderzoeken, welke reduceerende stoffen van het bloed zij hebben bepaald.

Een volkomen analyse van het koolhydraatmengsel van het bloed zal voorloopig nog moeilijk, ja waarschijnlijk nog langen tijd onmogelijk blijken. Een hernieuwde poging daartoe, waarbij naast de oude ook nieuwe hulp-

middelen in toepassing worden gebracht (o. a.: verschillende soorten zuiver gekweekte gistcellen, en een nieuwe, zeer gevoelige reductie-methode), wordt door de talrijke onopgeloste vraagstukken en tegenstrijdige waarnemingen op dit gebied wel voldoende gemotiveerd.

EIGEN ONDERZOEK.

I.

Onderzoek der suikers uit runder- en paardenbloed door middel van phenylhydrazine.

Om de in het bloed aanwezige suikers in een eiwitvrije, geconcentreerde oplossing te verkrijgen, waaruit zij als phenylosazonen zouden kunnen worden afgescheiden, ben ik als volgt te werk gegaan:

Porties van 2 liter gedefibrineerd versch runder- of paardenbloed worden van eiwit bevrijd door ze onder omroeren te schenken in een pan, bevattende 8 L. kokend water met 90 cc. normaal H Cl, en, terwijl de geheele massa goed doorkookt, voorzichtig nog zooveel (gewoonlijk 10–25 cc.) n. H Cl eraan toe te voegen, dat ook na 10 minuten doorkoken de reactie der vloeistof zeer zwak zuur blijft tegenover lakmoes. Daarna wordt de massa gezeefd door een metalen zeef, en gefiltreerd door middel van een zuigfilter door samengeperste pap van filtreerpapier; het coagulum wordt stevig uitgeperst, en het perssap ook gefiltreerd; het waterheldere, nagenoeg kleurlooze filtraat wordt op het waterbad bij zeer zwak zure reactie tot ± 500 cc. ingedampt en nog eens gefiltreerd.

De ingedampte vloeistof is thans nog niet volkomen vrij van eiwitstoffen. Om deze te verwijderen wordt 50 cc. toegevoegd van een oplossing van 10 % phosphorwolfraamzuur in 5 % H_2SO_4, eenige malen flink geroerd, en na 3 uur staan het neerslag afgefiltreerd. Vervolgens wordt het filtraat met gepulveriseerde Ba (OH_2)

geneutraliseerd, en weer gefiltreerd; de na toevoeging van Na_2SO_4 in dit filtraat ontstaande troebelheid geeft aan, dat er overmaat van $Ba(OH)_2$ in aanwezig is, en dat dus alle PW *) en H_2SO_4 is gebonden en verwijderd. Na aanzuren met enkele droppels azijnzuur wordt nu het filtraat in een uitdampschaal op het waterbad zacht verwarmd, en zooveel Na_2SO_4 er aan toegevoegd, totdat in een gefiltreerd proefje toevoeging van een kristal Na_2SO_4 geen troebelheid meer veroorzaakt. Dan wordt de vloeistof, door ze warm te filtreeren, van het $BaSO_4$ bevrijd, en het filtraat tot ± 50 cc. ingedampt en nog eens gefiltreerd.

Het aldus verkregen, sterk ingedampte bloeddecoct bevat nu naast koolhydraten en zouten slechts weinig stikstofhoudende stoffen, en is geschikt om de suikers als phenylosazonen eruit af te scheiden. Hiertoe worden ± 2 gram zoutzure phenylhydrazine, ± 5 gram natriumacetaat, en nog enkele droppels azijnzuur eraan toegevoegd; na omschudden (en, zoo noodig, zachte verwarming) wordt gefiltreerd, en vervolgens het filtraat *in* het kokende waterbad 1 à $1^1/_2$ uur op 100° verhit, in een kookkolfje met een trechter op den hals.

Na het koken bevat de vloeistof een groote massa geel kristallijn neerslag, dat door kokend filtreeren van de vloeistof wordt gescheiden en — onder het microscoop bezien — uit bundels van lange, rechte, gele kristalnaalden blijkt te bestaan, zooals ze als karakteristiek voor den kristalvorm van phenylglycosazon worden beschreven. — Wanneer men het filtraat langzaam laat afkoelen, wordt dit spoedig troebel; en den volgenden dag is een gele kristallijne massa bezonken, die zich geheel anders voordoet dan het in warm water onoplosbare osazon;

*) Hier en in 't vervolg staat »PW« voor »phosphorwolfraamzuur«.

in tegenstelling tot dit laatste n.l. vertoont zich het osazon uit het filtraat onder het microscoop nooit als bundels van lange naalden, maar steeds als veel kortere, fijnere, nu eens rechte, dan weer meer gekromde naalden, die deels tot dichte bollen vereenigd, deels tot rosetten gegroepeerd, deels ook solitair voorkomen. Dit in warm water oplosbare, in koud water onoplosbare osazon, dat uit elke portie bloed naast het glycosazon op de beschreven wijze kan worden afgescheiden, zal in het vervolg van deze verhandeling onder den naam **X-osazon** worden aangeduid.

Het glycosazon wordt gezuiverd door de kristallen op het filter eenige malen met kokend water uit te wasschen, en ze vervolgens in enkele cc. pyridine op te lossen, na toevoeging van overmaat van water door indampen (in een vacuum-exsiccator boven H_2SO_4) weer te laten uitkristalliseeren, af te centrifugeeren, en dit omkristalliseeren uit pyridine eenige malen te herhalen. Ten laatste wordt het afgecentrifugeerde osazon na uitwasschen met water in een reageerbuis gebracht, daarin met een ruime hoeveelheid water gekookt, op een gehard filter overgebracht, nog eenige malen met kokend water nagewasschen, van het filter af op een horlogeglas verzameld, en daarop in den exsiccator gedroogd.

De zuivering van het X-osazon geschiedt door het, na afcentrifugeeren en eenige malen uitwasschen met koud water, in een reageerbuis in enkele cc. water *onder langzame verhitting* tot $\pm$ 90° op te lossen, en door warm filtreeren van de onoplosbare bestanddeelen (in hoofdzaak kleine hoeveelheden glycosazon) te scheiden. In het filtraat kristalliseeren dan bij het afkoelen de fijne naaldjes weer uit, die daarna nog eens of meer-

malen door omkristalliseeren uit warm water verder gezuiverd kunnen worden. In tegenstelling tot het glycosazon is het X-osazon in koud water niet geheel onoplosbaar, zoodat bij het omkristalliseeren telkens een gedeelte ervan verloren gaat.

Het aldus gezuiverde X-osazon bestaat uit fijne, korte, lichtgele naalden: deels gegroepeerd tot bolvormige conglomeraten (zooals men dit vindt bij lactosazon), deels tot rosetten (zooals dit o. a. voor iso-maltosazon wordt beschreven), deels ook solitair voorkomend; enkele malen vertoonden zich naast de fijne, spitse naalden ook breedere, platte kristallen met afgeronde uiteinden (maltosazon-vorm). Tenslotte zij nog vermeld, dat ik ook herhaalde malen in het microscopische preparaat an X-osazon naast de naaldenbollen niets dan rosetten van lange, dunne, fraai-gebogen naalden vond: geheel het typische uiterlijk van de in sommige gevallen uit urine te bereiden Cammidge-kristallen (»long, flexible, hair-like crystals«[1]). — Wel is het groote onderscheid in kristalvorm met glycosazon sterk sprekend; maar toch is de kristalvorm der osazonen (vooral waar ze uit mengsels van verschillende koolhydraten worden bereid) zóó veranderlijk, dat uit het uiterlijk alleen nog niets omtrent den aard van het osazon mag worden besloten. Zoo zag ik eenerzijds de lange, gebogen naalden na omkristalliseeren zelden meer in den vorm van Cammidge-kristallen, maar meestal als veel kortere, rechte naaldjes uitkristalliseeren (ook Cammidge-kristallen uit urine kan men na omkristalliseeren zelden meer in hun oorspronkelijken vorm terugkrijgen). Andererzijds is zelfs het onderscheid tusschen de kristalnaalden van glycosazon

---

[1]) Cammidge: Proceed. of the royal Soc. of London, **81**, 374 (1909).

en X-osazon niet altijd even scherp; wanneer men b.v. X-osazon uit pyridine in plaats van uit warm water omkristalliseert, vertoont het zich als bundels van rechte, vrij lange naalden, die veel op glycosazonkristallen gelijken; en wanneer men glycosazon bereidt uit zuivere glycose (door reductie en polarisatie gecontroleerd), blijkt na kokend filtreeren een geringe hoeveelheid glycosazon eerst in het afkoelende filtraat uit te kristalliseeren, en dan niet als bundels van lange naalden, doch als kortere, fijnere kristalnaalden.

Is dus de kristalvorm als diagnosticum voor het osazon van weinig waarde, — een zeer betrouwbaar onderscheidingskenmerk is in de oplosbaarheid gegeven. Het zoo juist besproken, in 't afkoelende filtraat uitgekristalliseerde glycosazon is, nadat het zich eenmaal als kristallijne massa heeft afgezet, in kokend water niet meer op te lossen (dientengevolge is dan ook het X-osazon door omkristalliseeren uit warm water geheel van verontreiniging met glycosazon te bevrijden). Het X-osazon lost in warm water (± 90°) steeds geheel op; wel-is-waar niet in 4 deelen water (zooals iso-maltosazon), maar wel in ± 50 deelen water.

Het diagnosticum is ten slotte: de bepaling van het smeltpunt der osazonkristallen. Bij snelle verhitting*) van het glycerine-bad (volgens het voorschrift van Emil Fischer: per 2—3 secunden 1° stijging van temperatuur) smelt het »glycosazon«, uit koeienbloed bereid, bij **209°** **), dat uit stierenbloed bij **210°**, dat uit paarden-

*) Bij langzamer verhitting (1° per 6—8 sec.) worden veel lagere smeltpunten gevonden: voor glycosazon: 196—198°, voor X-osazon (vgl. p. 46): 178—183°.

**) Voor zoover niet het tegendeel is vermeld, zijn alle opgegeven smeltpunten gecorrigeerd.

bloed bij **209°**. Deze uitkomst, die in overeenstemming is met de door alle andere onderzoekers gevonden waarde, en met de waarde die we ook op grond van vorm en oplosbaarheid der kristallen reeds konden verwachten, bewijst dus nog eens, dat in het bloed een hexose voorkomt. Uit de vergistbaarheid dezer hexose door specifieke gistcellen (zie hoofdst. II en IV), en uit de vermindering in rechtsdraaiend vermogen, die het bloeddecoct bij deze vergisting ondergaat, kunnen we besluiten, dat deze hexose niet fructose of mannose, maar d-glycose is.

Het smeltpunt van het X-osazon is minder gemakkelijk waar te nemen. Deze kristallen toch, die reeds tijdens het drogen bij kamertemperatuur in vacuo donkerder-geel van kleur worden, nemen bij de verhitting bij ± 150° een donkerbruine tint aan, beginnen bij ± 178° te schrompelen, en smelten bij **186–191°**. Voor verschillende preparaten van X-osazon vond ik de volgende smeltpunten:

Bloed van:	Smeltpunt X-osazon:
Koe	186–189°
»	189–191°
Stier	187–188°
Paard	186–188°
»	189–191°

Het oogenblik van smelting is meestal niet scherp waar te nemen.

Er is geen enkel koolhydraat bekend, welks osazon in warm water oplosbaar is en een smeltpunt van ± 188° vertoont. Het gevonden smeltpunt geeft dus geenerlei aanwijzing omtrent den aard van de suiker X, behalve deze: dat het nu — na hetgeen reeds de kristalvorm deed vermoeden — nog waarschijnlijker wordt, dat het X-osazon

niet een enkelvoudige stof is, doch een mengsel van de phenylosazonen van twee (misschien nog meer?) verschillende suikers.

De volgende waarneming is in dit verband van belang. Terwijl ik, door het omkristalliseeren uit warm water nog meer malen te herhalen, het smeltpunt van het X-osazon meestal hetzelfde zag blijven, had één preparaat van X-osazon (uit koeienbloed) na 3 maal omkristalliseeren een smeltpunt van **199—200°**. Daar ik twijfelde aan de juistheid dezer waarneming, heb ik de smeltpuntbepaling van dit osazonpreparaat nog tweemaal herhaald: steeds met dezelfde uitkomst. Het microscopische beeld der kristallen gaf nu niets dan tot bollen gegroepeerde naalden te zien; in kristalvorm en smeltpunt stemde het osazon dus volkomen overeen met dat van **lactose.** Deze waarneming bracht mij het eerst op het vermoeden, dat lactosazon steeds een der bestanddeelen van X-osazon zou zijn (immers: de naaldenbollen zijn bijna steeds erin te vinden), en het andere bestanddeel (osazon van de suiker **Y**) vermoedelijk een smeltpunt, lager dan 186—191°, zou hebben. Door mijn verdere onderzoek werd dit vermoeden bevestigd. Dat ik in andere proeven nooit meer een X-osazon met smeltpunt $> 191°$ uit runder- of paardenbloed heb kunnen bereiden, kan ik niet anders verklaren dan door de veronderstelling: dat in het uitzonderingsgeval lactose in abnormaal groote, of de suiker Y in abnormaal geringe hoeveelheid in het koeienbloed aanwezig was.

Naar aanleiding van de mededeeling van LEMAIRE[1]), dat in de urine van den mensch (naast glycose en een dextrineachtige stof) isomaltose voorkomt, en naar aanleiding

[1]) Over het Voorkomen van Koolhydraten in de Urine van den gezonden Mensch, enz. Diss. Utrecht, p. 44 (1895).

van het onderzoek van PAVY en SIAU[1]), waardoor min of meer waarschijnlijk wordt gemaakt, dat ook in het bloed iso-maltose aanwezig is, had ik verwacht een X-osazon te verkrijgen, dat bij 151–153° (smeltpunt van iso-maltosazon) zou smelten. Het verschil tusschen dit smeltpunt en het constant door mij gevondene (186–191°) is wel zeer groot. — Als ik, vóór de toevoeging van phenylhydrazine, het bloeddecoct eerst 10–30 minuten met 2% citroenzuur of met 1% zoutzuur had gekookt, dan had deze voorbewerking nooit eenigen invloed op kristalvorm en smeltpunt van het X-osazon. X moet dus een suiker zijn, die bij koken met 2% citroenzuur of 1% zoutzuur niet of zeer langzaam gesplitst wordt, zooals o.a. de disacchariden lactose en melibiose; iso-maltose valt bij koken met verdunde zuren binnen enkele minuten in 2 moleculen glycose uiteen.

Dit alles — en nog meer, later te noemen, argumenten (zie hoofdst. V en VI) — maakt de aanwezigheid van iso-maltose in runder- en paardenbloed wel uiterst onwaarschijnlijk. Toch is — gezien de nagenoeg volkomen onbekendheid der naast glycose in het bloed voorkomende koolhydraten, en de onbekendheid van den invloed van stoffen als dextrine e. a. op de eigenschappen van het osazon — de mogelijkheid niet uit te sluiten, dat het X-osazon voor een gedeelte uit iso-maltosazon zou bestaan. Om meer zekerheid hieromtrent te verkrijgen, heb ik het osazon ook uit bloed bereid volgens de methode, door LEMAIRE voor urine gebezigd.

LEMAIRE [2]) isoleerde de koolhydraten der urine door ze (volgens de methode van BAUMANN-WEDENSKI) als

---

[1]) Journal of Physiology **26**, 282 (1901).

[2]) l.c., p. 15 en 32.

benzoylester neer te slaan. Uit de verzamelde porties benzoylester verkreeg hij dan door verzeeping met natrium-aethylaat en behandeling met verdund zwavelzuur, aether (ter verwijdering van het benzoëzuur) en alcohol (ter verwijdering van het $NaHSO_4$ en van de dextrine), na indampen een oplossing, die naast enkele zouten slechts mono- en di-sacchariden bevatte, en waarin hij de verschillende suikers (glycose en iso-maltose) op grond van hun gedrag tegenover Fehling's proefvocht, gepolariseerd licht, gist en phenylhydrazine kon aantoonen.

Op volkomen dezelfde wijze heb ik verschillende porties, door koken en door PW van eiwit bevrijd, runderbloed (dat ± 0.2 % koolhydraten, in glycose uitgedrukt, bevatte), na verwijdering van de phosphaten en na toevoeging van 48 cc. 10 % NaOH en 4 cc. benzoylchloride per 100 cc. vloeistof, één uur lang met de hand geschud (onder afkoeling met koud water), den gevormden ester door een zuigfilter (gehard filtreerpapier op een Buchner-trechter) afgefiltreerd, met water tot neutrale reactie uitgewasschen, en in den vaccuum-exsiccator boven zwavelzuur gedroogd. Uit 34 L. bloed verkreeg ik op deze wijze 5,2 gram benzoylester. Deze ester werd vervolgens, na zorgvuldig te zijn fijngewreven tot een lichtgeel poeder, op de door LEMAIRE beschreven wijze met natriumaethylaat bij —5° verzeept; en na behandeling met verdund H_2SO_4, aether en 92 % alcohol ($2^1/_2$ vol.) werd een oplossing verkregen, die naast enkele zouten de koolhydraten van het bloed bevatte. Deze vloeistof draaide het gepolariseerde licht naar rechts.

De oplossing werd tot 100 cc. ingedampt en daarna met 900 cc. 92 % alcohol vermengd; daardoor sloeg een

wit-vlokkige massa neer, uit zouten + polysacchariden bestaande; deze massa werd door herhaald oplossen in water en neerslaan met alcohol gezuiverd, en tenslotte met absoluten alcohol en aether uitgewasschen en in vacuo gedroogd. Zoo werd een nagenoeg wit, fijn, hygroscopisch poeder verkregen, dat geheel vrij van stikstof bleek te zijn (reactie van LASSAIGNE: negatief). Deze stof gaf met J geen glycogeenreactie, en had geen reductie-vermogen; eerst na ± 30 minuten met 1 % HCl in het kokende waterbad te zijn verhit, reduceerde zij duidelijk Fehling's proefvocht en de oplossing van BENEDICT. De waterige oplossing der stof was lichtgeel gekleurd en helder. Met NaOH en $CuSO_4$ ontstond een lichtblauw, vlokkig neerslag, dat bij koken niet van kleur veranderde. Door deze laatste eigenschap en door de langzame hydrolyse bij verhitting met HCl kenmerkt het polysaccharide uit het bloed zich als een gom. *) — Of naast deze gom ook nog dextrinen in het bloed voorkomen, kon op deze wijze niet worden nagegaan, daar de dextrinen reeds door het phosphorwolfraamzuur uit het bloeddecoct moeten zijn verwijderd.

Na het verwijderen van de gom hield ik dus de suikers van het bloed over in zoo goed mogelijk gezuiverde oplossing. Deze oplossing vertoonde een rechtsdraaiing, groot 22′ (bij l = 2 d.M.), hetgeen zou overeenkomen met **0,35** % glycose, indien alle suiker als glycose aanwezig was; een reductie-bepaling leerde, dat het gehalte van de oplossing aan reduceerende stoffen — als glycose

*) Daar de gom (tengevolge van de wijze van bereiding) nog sterk met zouten verontreinigd was, moest ik van een C- en H-bepaling afzien. Om de gom vrij van zouten te krijgen, zou men haar reeds moeten affiltreeren, voordat zij door toevoeging van water aan het natriumaethylaat wordt opgelost.

berekend — **0,50** % bedroeg. *Hieruit valt te besluiten, dat naast glycose en een gom in het bloed nog een suiker voorkomt, die òf sterker reduceert dan glycose, òf zwakker rechtsdraaiend is, òf zoowel in reduceerend als in rechtsdraaiend vermogen van glycose verschilt.*

Uit deze oplossing heb ik weer de suikers als phenyl-osazonen afgescheiden en gezuiverd. PAVY [1]) merkt op, dat te groote overmaat van phenylhydrazine het iso-maltosazon in oplossing zou houden; ik heb daarom ervoor gezorgd, dat het phenylhydrazine slechts in geringe overmaat werd toegevoegd. De op deze wijze verkregen osazonen kwamen in al hun eigenschappen overeen met die, welke ik op de meer directe wijze uit bloed had bereid; het glycosazon smolt bij **208°**, het X-osazon bij **186—188°**.

Zooals ook wel te verwachten was, blijkt hieruit: dat het door koken (bij neutrale tot zwak zure reactie) en door P W van eiwit bevrijde bloeddecoct geen stoffen meer bevat, die op de eruit te bereiden osazonen merk-baren invloed hebben. Ik heb dan ook in het vervolg bij het zuiveren der bloedsuikeroplossing de omslachtige benzoylchloride-methode als overbodig achterwege gelaten.

---

[1]) Journal of Physiology **26**, 286 (1901).

II.

Bereiding van osazon uit het bloed na verwijdering der vergistbare suikers door zuiver gekweekte gistcellen.

Door de welwillendheid van PROF. DR. BEYERINCK en van DR. KLUYVER daartoe in staat gesteld, had ik te mijner beschikking een drietal stammen van specifieke gistcellen, n.l.: *Torula monosa*, *Saccharomyces cerevisiae* (ondergist van »de Oranjeboom«) en *Lactosegist 2*. Voor de bijzonderheden dezer gistsoorten raadplege men: KLUYVER: Biochemische Suikerbepalingen (Diss. Delft 1914).

Deze zuiver gekweekte gistcellen bieden boven de bij vroegere onderzoekingen op dit gebied gebruikte persgist uit den handel het groote voordeel: dat zij slechts bepaalde koolhydraten vergisten, dat alle bacteriewerking kan worden uitgesloten, en dat de verontreiniging van de vloeistof (met stofwisselingsproducten van de gist) tot een minimum kan worden beperkt, daar geringe hoeveelheden gist voldoende zijn.

In de tabel op p. 53 wordt aangegeven, welke koolhydraten door de gistsoorten worden vergist. + beteekent: snelle vergisting; (+): langzame vergisting; —: geen vergisting. De tusschen haakjes geplaatste suikers hebben geen vrije carbonylgroep; deze hebben dus geen reductievermogen en vormen geen osazon. — Zooals uit de tabel blijkt, vergist T. monosa slechts de hexosen glycose, fructose en mannose; S. cerevisiae vergist deze zelfde hexosen, en bovendien galactose (langzaam) en saccharose,

Koolhydraten:	Vergistbaarheid met:		
	T. monosa	*S. cerevisiae*	*Lactosegist.*
Glycose	+	+	+
Fructose	+	+	+
Mannose	+	+	+
Galactose	—	(+)	+
(Saccharose)	—	+	+
Maltose	—	+	—
Lactose	—	—	+
Melibiose	—	+	+
(Raffinose)	—	+	+
Iso-maltose	—	—	—
Pentosen	—	—	—
Glycuronzuur	—	—	—
(Dextrinen)	—	—	—

maltose, melibiose en raffinose; lactosegist verschilt van S. cerevisiae, doordat door lactosegist maltose in 't geheel niet, galactose en lactose daarentegen snel worden vergist. Iso-maltose, pentosen, glycuronzuur en dextrinen worden door geen der 3 gistsoorten aangetast.

Door aan de bereiding van het osazon, zooals deze in hoofdstuk I werd beschreven, vergisting van het bloed-decoct met elk der 3 gistsoorten te doen voorafgaan, moest nu kunnen worden uitgemaakt, of het X-osazon soms geheel of gedeeltelijk uit lactose, maltose of melibiose was gevormd. Galactose kan buiten beschouwing gelaten worden, daar galactosazon in warm water niet oplost.

Het bloed werd in alle proeven vergist vóór de zuivering met PW, omdat het dan nog genoeg voedingsstoffen voor de gistcellen bevat, om een goeden groei der gistcellen en een snelle, volledige vergisting der suikers

te doen plaats hebben. Het bloeddecoct werd dan eerst in porties van 500 cc. gesteriliseerd door 10 minuten koken in vooraf bij 150° gesteriliseerde kolven; vervolgens werden 3 à 4 platina-oogjes vol gist toegevoegd. De aldus geënte vloeistof werd ± 42 uur boven op de broedstoof van 38° geplaatst (waarbij dan de temperatuur der vloeistof 25–30° bedroeg: de optimale temperatuur voor de gisting). Na afloop der gisting overtuigde ik mij steeds, dat de gist-cellen goed gegroeid waren (aanwezigheid van gistcellen met knopvorming in de bovenste helft der vloeistof), en dat de vloeistof niet met bacteriën was verontreinigd. Bovendien was mij ook door de in bijna alle proeven ingestelde reductie-bepalingen (zie hoofdstuk IV) gebleken, dat na 18 uur gisting het reduceerend vermogen der vloeistof nagenoeg niet meer, en na 24 uur gisting in het geheel niet meer daalde; daaruit mag worden besloten, dat — in deze omstandigheden van temperatuur en concentratie — na 42 uur de gisting zeker volledig was.

Na de gisting werd het bloeddecoct weer op de gewone wijze door PW van de nog aanwezige eiwitstoffen (en gistcellen) bevrijd, met $Ba(OH)_2$ en Na_2SO_4 behandeld, en tot ± 50 cc. ingedampt. Uit de ingedampte vloeistof werd weer het osazon bereid. — Daar het mogelijk was, dat bij de stofwisseling der gistcellen een stof in het bloed overging, die ook een kristallijne verbinding met phenylhydrazine vormt, werd dit door een blanco-proef gecontroleerd. In deze blanco-proef gebruikte ik als voedingsvloeistof voor de gist: gedestilleerd water met 0,5 % glycose, 0,3 % asparagine, 0,1 % KH_2PO_4 en 0,05 % $MgSO_4$; na 42 uur gisting werd deze vloeistof met dezelfde preparaten van PW, $Ba(OH)_2$, Na_2SO_4, zoutzure phenylhydrazine en natriumacetaat behandeld, zoodat tegelijk kon worden gecontroleerd, of een even-

tueele verontreiniging van een dezer stoffen deel kon hebben aan de vorming van het uit bloeddecoct verkregen osazon. In deze controle-proeven, die met de 3 gistsoorten werden verricht, was het resultaat: dat geen spoor van een kristallijne phenylhydrazine-verbinding werd gevormd.—

Hier volgen de uitkomsten van het onderzoek der osazonen uit het vergiste bloeddecoct.

Na vergisting met *T. monosa* werd een osazon verkregen, dat geen glycosazon meer bevatte, en dat (zooals te verwachten was) in oplosbaarheid, kristalvorm, en ook in hoeveelheid, geheel overeenkwam met het vroeger door scheiding van glycosazon uit het onvergiste bloed verkregen X-osazon. Het smeltpunt van het osazon, na vergisting met T. monosa verkregen, bleek ook met dat van X-osazon overeen te stemmen: **186-188°**.

Vergisting van het bloed met *S. cerevisiae* gaf hetzelfde resultaat als de vergisting met T. monosa. Daar ook de reductie-bepalingen (zie hoofdst. IV) geen enkel verschil aan het licht brengen tusschen de werking dezer beide gistsoorten op het bloed, mogen wij besluiten, dat runder- en paardenbloed onder normale omstandigheden geen maltose of melibiose bevat.

De vergisting met *lactosegist* gaf een andere uitkomst. Uit het bloed van de koe werd na vergisting met lactose-gist een geringere hoeveelheid osazon verkregen, dan na de enting met T. monosa of met S. cerevisiae; we zullen die rest: **Y-osazon** noemen. Het Y-osazon, dat, wat oplosbaarheid in warm water betreft, zich niet van X-osazon onderscheidt, vertoont wel een anderen kristalvorm: in plaats van de kortere of langere naalden (10—25 μ), tot rosetten en daarnaast tot bollen gegroepeerd, vertoont het Y-osazon na één maal omkristalliseeren in zijn microscopisch beeld niets dan zeer korte, fijne naaldjes (niet

langer dan 3—6 μ), solitair of tot stervormige groepjes vereenigd. Een enkele maal ook kwam na vergisting met lactosegist een osazon in den vorm van lange, dunne, gebogen naalden (Cammidgekristallen) voor den dag. De naalden*bollen* ontbreken dus! En daar het verschil in vergistende eigenschappen van lactosegist en S. cerevisiae daarin bestaat, dat door lactosegist lactose wel, door S. cerevisiae lactose niet wordt vergist, dringt zich het reeds vroeger geuite vermoeden, dat de naaldenbollen uit lactosazon zouden bestaan, nog sterker op.

Het Y-osazon uit het koeienbloed vertoonde overigens macroscopisch dezelfde lichtgele, bij 't drogen donkerder wordende kleur als het X-osazon; het smeltpunt (scherper waar te nemen dan dat van X-osazon) bleek te zijn: **181—182°** (schrompelen bij ± 170°). Ook uit stieren-bloed en uit paardenbloed kon, na enting met lactosegist, ditzelfde Y-osazon worden verkregen: schrompelen bij 170—175°, smelten bij **182°**. Meermalen omkristalliseeren gaf geen verandering van dit smeltpunt.

Is het, na dit alles, zeer waarschijnlijk, dat in het runder- en paardenbloed een geringe hoeveelheid lactose voorkomt en het X-osazon dus een mengsel is van lactosazon en Y-osazon, dan rest de oplossing van de vraag: wat is Y?

We weten thans alleen: dat Y is een door de gebruikte gistsoorten onaantastbare suiker, die een in warm water oplosbaar phenylosazon levert, met smeltpunt 181—182°. Y kan dus niet zijn: glycose, fructose, mannose, galactose, saccharose, maltose, iso-maltose, lactose, melibiose of raffinose. Ook kan het geen dextrine-achtige stof of ander polysaccharide zijn, daar deze onder de gegeven omstandigheden met phenylhydrazine geen kristallijne verbinding vormen; na verwijdering van alle polysacchariden uit

het bloeddecoct (door middel van 80% alcohol) is dan ook uit het filtraat nog een onverminderde hoeveelheid Y-osazon te bereiden. Ten slotte kan ook worden uitgesloten, dat Y-osazon een phenylhydrazine-verbinding van glycuronzuur zou zijn; want bij temperaturen, hooger dan 40° C., zijn de verbindingen, die glycuronzuur met phenylhydrazine in azijnzure oplossing vormen kan, zeer onbestendig. (Vgl. het hierover opgemerkte op p. 24 (noot) en p. 26.)

Wanneer men de literatuur over koolhydraten nagaat, ontmoet men 2 suikers, waarvan de phenylosazonen in warm water oplosbaar zijn en bij ± 182° smelten, n.l. melibiose en het koolhydraat van CAMMIDGE. Daar melibiose zoowel door S. cerevisiae als door lactosegist vergist wordt, kan Y niet identiek met melibiose zijn. In de meeste eigenschappen lijkt Y echter zooveel op melibiose *), dat het vermoeden gewettigd is, dat beide suikers nauw aan elkaar verwant zijn. — Het koolhydraat van CAMMIDGE wordt verkregen, door urine (van menschen, die koolhydraatrijk voedsel gebruiken, of van sommige lijders aan chronische pancreas-aandoeningen) te koken met verdund HCl; de suiker ontstaat dan door de hydrolytische splitsing van de gom uit zulke urine [1]);

*) Melibiose is volgens FISCHER en ARMSTRONG [E. F. ARMSTRONG: The simple Carbohydrates and the Glucosides, p. 66 (1912)] identiek met het synthetisch bereide galactosido-glycose. Het wordt eerst door 36 uur koken met sterke zuren in glycose + galactose gesplitst. Melibiose-phenylosazon kristalliseert als fijne, gele, licht-gebogen naalden, die bij 178—179° smelten, en bij 181—183° onder gasontwikkeling ontleden. Het osazon lost op in 110 deelen warm water, en scheidt zich bij het afkoelen gedeeltelijk als het anhydride af, dat in water onoplosbaar is. [Naar: E. VON LIPPMANN, Die Chemie der Zuckerarten, p. 1585—1595 (3. Aufl. 1904)].

[1]) PEKELHARING en VAN HOOGENHUYZE: Zeitschr. f. physiol. Chemie **91**, 151 (1914).

het phenylosazon van de suiker vormt bij het uitkristalliseeren rosetten van lange, fijne, gebogen naalden, — na omkristalliseeren uit warm water gaat deze kristalvorm meestal weer verloren, en zijn niets dan zeer korte, fijne naaldjes te zien. Het osazon smelt volgens CAMMIDGE [1]) bij 178—180°, volgens PEKELHARING en VAN HOOGENHUIJZE bij 173—177° (ongecorrigeerd). De samenstelling der suiker is niet nauwkeurig bekend. CAMMIDGE vond in zijn osazon ± 16,88 % stikstof, en vermoedt dat de suiker een pentose is. PEKELHARING en VAN HOOGENHUIJZE, die de stof beter zuiverden, vonden daarentegen, dat zij geen pentose-reacties geeft, en dat het osazon gemiddeld 11,66 % stikstof bevat, zoodat de suiker ongeveer 12 koolstofatomen per molecule zou bezitten. Tegen koken met verdunde zuren is het koolhydraat van CAMMIDGE bestand, zooals uit de wijze van bereiding volgt. Ook is het onvergistbaar door biergist [1]); dit was ook al door LANDWEHR [2]) gevonden voor de suiker, die hij door hydrolyse van »dierlijke gom« uit urine had verkregen.

Ik heb nog getracht, uit runderbloed een voldoende hoeveelheid Y-osazon te bereiden, ten einde een stikstofbepaling ervan te kunnen verrichten. 100 mg osazon had ik verzameld, toen de beperking van het gasrantsoen gebood, het indampen op groote schaal te staken. Tot overmaat van ramp heb ik deze hoeveelheid Y-osazon bij het omkristalliseeren op verkeerde wijze verhit (te snel verhit: de ondanks het schudden steeds weer onder in de reageerbuis samenklonterende kristalmassa werd te dicht bij de gasvlam gehouden); het gevolg hiervan was,

---

[1]) Proceed. of the Royal Soc. of London **81**, 374—375 (1909).
[2]) Zeitschr. f. physiol. Chemie **8**, 127 (1884).

dat een gedeelte van de kristallen onder bruinkleuring ontleedde en niet meer tot oplossing kwam. De hoeveelheid in het afkoelende filtraat uitgekristalliseerd osazon bedroeg na het drogen slechts 45 mg, kleurde zich in den exsiccator reeds binnen enkele dagen donkergeel tot bruin, en vertoonde een zeer afwijkend smeltpunt: 160° (schrompeling reeds bij 140°, ontleding onder gasontwikkeling bij 167°). Dit bewijst wel, dat het omgekristalliseerde osazon nog met ontledingsproducten verontreinigd was (al was die verontreiniging in het microscopische preparaat niet zichtbaar geweest). Een reden te meer, om bij het omkristalliseeren de verwarming uiterst voorzichtig te doen geschieden: òf in het waterbad, òf — onder voortdurend omschudden — op voldoenden afstand van de vrije vlam.

Kan aan het smeltpunt, wegens de onzuiverheid van het osazon, dus geen waarde gehecht worden, — van de stikstofbepaling behoeft dit niet te worden aangenomen. Immers: in de eerste plaats is het niet te verwachten, dat de geringe verandering, die een klein gedeelte van het osazon bij de onvoorzichtige verhitting heeft ondergaan, merkbare verandering van het stikstofgehalte van het geheele preparaat ten gevolge zal hebben. En in de 2de plaats moet aan de stikstofbepaling nog wel een relatieve waarde worden toegekend, omdat de groote groepen: mono-, di- en polysacchariden aanzienlijke verschillen in het N-gehalte van hun osazonen vertoonen. Zoo heeft b. v. hexosazon een N-gehalte van **15,64** % (pentosazon: 17,07 %, glycuronzuur-phenylhydrazine-verbindingen: 15,05—18,18 %); de osazonen der di-saccharíden bevatten **10,77** % stikstof; die der tri-saccharíden etc.: **8,21** % of minder.

Van de geringe hoeveelheid overgebleven osazon (nog

geen 40 mg) werd nu volgens de methode van KJELDAHL het N-gehalte zeer nauwkeurig bepaald. Daar het N-gehalte slechts enkele milligrammen zou bedragen, en derhalve een nauwkeurigheid tot in enkele honderdste deelen van milligrammen vereischt werd (welke nauwkeurigheid, blijkens genomen controle-proeven, werkelijk bereikt is), was het hier in 't bijzonder noodig, door middel van een blanco-proef de sporen stikstof, in de bij de bepaling gebruikte reagentia aanwezig, te bepalen en in rekening te brengen. Op deze wijze werd gevonden, dat in 34,66 mg van het Y-osazon (in fijn verdeelden toestand in vacuo eenige dagen lang gedroogd) aanwezig was 3,563 mg stikstof, of **10,28** %.

Het onderzoek van het osazon heeft dus betreffende de samenstelling van het koolhydraat Y niet meer gegevens kunnen verschaffen dan deze: dat het een suiker is met ± 12 koolstof-atomen, en dat deze suiker met geen enkele der tot nu toe bekende di-sacchariden (behalve misschien met het — slechts zeer onvolledig bekende — koolhydraat van CAMMIDGE) identiek is.

III.

Over de bepaling van het reduceerend vermogen van vloeistoffen met het reagens van S. R. Benedict.

Voor de bepaling van de hoeveelheid glycose en andere reduceerende suikers, in een oplossing aanwezig, heeft STANLEY R. BENEDICT [1]) de volgende methode aanbevolen:

Van een oplossing, die per liter 18 gram gekristalliseerd kopersulfaat (nauwkeurig afgewogen), 200 gram gekristalliseerd natriumcarbonaat, 200 gram natriumcitraat, 125 gram kaliumrhodanaat en 5 cc. 5 % ferrocyaankalium bevat, brengt men 25 cc. uit een pipet in een witporceleinen schaal (diameter 25—30 c.M.), en voegt daarbij 10—20 gram gekristalliseerd natriumcarbonaat (al naar de te verwachten verdunning) en een kleine hoeveelheid gepulveriseerde puimsteen. Deze vloeistof wordt op de vrije vlam tot heftig koken verhit. Dan voegt men de suikeroplossing uit een buret eerst in een straal toe (maar nooit zoo snel, dat het koken afgebroken wordt), totdat een groot wit praecipitaat ontstaat en de blauwe kleur merkbaar begint af te nemen in intensiteit. Vervolgens wordt de suikeroplossing langzamer toegevoegd (onder voortdurend heftig koken), totdat het laatste spoor van blauwe kleur verdwijnt. Tegen het einde moet de suikeroplossing worden toegevoegd in porties van 1 of 2 droppels, met een interval van ± 30 secunden tusschen iedere toevoeging. Wordt het mengsel door het indampen te sterk geconcentreerd, dan moet het door toevoeging

[1]) The Journal of biol. Chemistry **9**, 57 (1911).

van gedestilleerd water weer worden verdund. 25 cc. der koperoplossing worden gereduceerd door 50 m g glycose of door 53 m g levulose. — Bij de vergelijking der uitkomsten met die van ALLIHN's gravimetrische methode en met polarimetrische bepalingen vond BENEDICT goede overeenstemming. Verontreinigingen, o. a. chloroform, geven soms aanleiding tot vorming van rood cupro-oxyde, en moeten daarom vermeden worden. Toevoeging van zout aan de suikeroplossing geeft geen verschil in uitkomst. Dank zij het gebruik van carbonaat als alkali zou volgens BENEDICT de koperoplossing uitsluitend door suikers worden gereduceerd; althans niet door acidum uricum, en nagenoeg niet door chloroform, chloral of formaldehyde (over kreatine, kreatinine en urochroom spreekt BENEDICT niet).

De methode van BENEDICT heeft werkelijk zeer groote voordeelen boven de reductie-methoden, waarbij Fehling's proefvocht wordt gebruikt:

a: Door Na_2CO_3 in plaats van NaOH of KOH als alkali te gebruiken is het bezwaar opgeheven, dat tijdens het koken suiker wordt vernield[1]); het reagens van BENEDICT heeft hierdoor veel aan nauwkeurigheid en gevoeligheid gewonnen: ook geringe hoeveelheden reduceerende stof kunnen ermee worden aangetoond en bepaald.

b: Door de aanwezigheid van KCNS in de alkalische koperoplossing wordt bij de reductie geen rood cupro-oxyde, maar wit cupro-rhodanaat gevormd; het verdwijnen van het laatste spoor van blauwe tint is daardoor scherp waar te nemen.

c: Door het Seignette-zout der oplossing van FEHLING

---

[1]) BENEDICT, The Journal of biol. Chemistry **3**, 101 (1907).

door natriumcitraat te vervangen heeft BENEDICT de duurzaamheid zijner oplossing verzekerd.

d: De geheele bepaling loopt in enkele minuten af.*)

Wanneer men echter de methode BENEDICT volgens dit oorspronkelijke voorschrift toepast en eenigszins groote eischen aan de nauwkeurigheid der bepalingen stelt, ondervindt men een aantal bezwaren, — vooral wanneer men de methode voor de bepaling van het suiker-gehalte van dierlijke vloeistoffen gebruikt (waarvoor ze, volgens BENEDICT, ook goede resultaten zou geven). Daarbij stuit men nl. al dadelijk op het bezwaar, dat de oplossing van BENEDICT (evenals Fehling's vloeistof en alle andere alkalische koper-, kwik- of bismuth-oplossingen) bij de quantitatieve suikerbepaling, waarbij — om de reductie volkomen te doen zijn — eenige minuten langer dan BENEDICT voorschrijft moet worden doorgekookt, ook door acidum uricum, kreatinine en andere reduceerende stoffen, die niet tot de suikers behooren, wordt gereduceerd. Dit bezwaar zou, voor zoover de vergistbare suikers betreft, te ontgaan zijn door de reductie-bepaling voor en na gisting uit te voeren. Er zijn echter nog meer bezwaren, die zich ook bij de bepaling van zuivere glycose-oplossingen doen gelden.

De titratie met 25 cc. koperoplossing en ± 15 gram Na_2CO_3 blijkt alleen dan goede uitkomsten te geven, wanneer het totale volumen van de vloeistof niet te ver boven 40—50 cc. stijgt of daaronder daalt (dit zal dus van de sterkte der suikeroplossing en van de heftigheid van het koken afhangen); alleen dan blijkt de 25 cc. koperoplossing juist door 50 mg glycose te worden

*) De (macro-)methode van BANG [Bioch. Zeitschr. **2**, 271 (1907)] heeft dezelfde voordeelen, maar het bezwaar, dat voor iedere bepaling een groote hoeveelheid koperoplossing noodig is.

gereduceerd. Wordt de koperoplossing verder verdund, dan is meer dan 50 mg glycose voor de reductie noodig (b.v. bij volumen 70 cc.: 52,5 mg), en men zou dus, indien men hiermee geen rekening hield, te lage waarden vinden. Wordt het reductiemengsel tot onder 40 cc. ingedampt, dan blijkt minder dan 50 mg glycose voor de reductie voldoende (bij vol. 30 cc.: 48 mg glycose) — waarschijnlijk ten gevolge van stijging van kookpunt en alkaliciteit der vloeistof —, wat te hooge uitkomsten tot resultaat zou hebben. De uitkomst der reductie-bepaling is dus in vrij sterke mate afhankelijk van de concentratie van de kokende vloeistof, in dien zin: dat men voor geconcentreerde suikeroplossingen te hooge, voor zeer verdunde suikeroplossingen te lage waarden vindt. — BENEDICT zelf heeft dit bezwaar ook ondervonden. Immers: hij schrijft voor, dat aan de koperoplossing *10 tot 20* gram Na_2CO_3 moet worden toegevoegd: minder of meer, al naar de te onderzoeken suikeroplossing meer of minder sterk reduceerend is; en ook voegt hij gedistilleerd water toe, wanneer tijdens de titratie de vloeistof »te sterk« wordt ingedampt. Deze beide voorschriften dienen blijkbaar, om steeds zooveel mogelijk bij gelijke concentratie en alkaliciteit te werken; en inderdaad kan men op deze wijze wel beter overeenstemmende uitkomsten krijgen, mits men niet met al te zwak reduceerende vloeistoffen (onder 0,08 %) te doen heeft; doch het behoeft nauwelijks gezegd, dat men, op deze ruw-schattende wijze concentratie en alkaliciteit van het reductie-mengsel regelende, nooit groote nauwkeurigheid kan bereiken. BENEDICT zegt, dat hij op deze wijze goede resultaten kreeg voor glycose-oplossingen van 0,1 tot 2,2 % (volgens ALLIHN gecontroleerd). Hij geeft echter geen cijfers en wij weten dus niet, welke

eischen hij aan de nauwkeurigheid zijner bepalingen stelde; maar heel hoog kunnen die eischen niet geweest zijn: dat blijkt, behalve uit het bovengenoemde, ook nog uit de volgende bezwaren der methode.

De reductie der alkalische koperoplossing door de ermee kokende reduceerende stoffen heeft voor het grootste gedeelte wel vrij snel plaats, maar is eerst na 2—4 minuten doorkoken volkomen. Houdt men geen rekening met den kookduur, dan kan men dus nooit constante uitkomsten verkrijgen, omdat bij onvoldoenden kookduur te lage waarden voor het reduceerend vermogen worden gevonden. Dit is — mede in verband met hetgeen over het meer of minder sterk indampen gezegd is — een reden, dat bepaalde, nauwe grenzen voor den kookduur moeten worden in acht genomen. BENEDICT geeft hiervoor geen enkel voorschrift.

Ten laatste is nog het bezwaar te vermelden: dat het witte cupro-rhodanaat door de zuurstof van de lucht weer vrij snel tot een blauw-groene cupri-verbinding geoxydeerd wordt. En het gevaar voor contact met de lucht is — ook al blijft de vloeistof heftig koken — in de platte, open porceleinen schaal van BENEDICT zeer groot.

Tengevolge van deze gebreken is, ondanks de voordeelen van BENEDICT's koperoplossing, de nauwkeurigheid van zijn methode zoo gering (slechts tot op 0,1 à 0,05 %), dat zij voor de bepaling van het reduceerend vermogen van normale urine en van bloed, en ook voor fijnere glycose-bepalingen, waarbij een nauwkeurigheid tot op 0,01 of 0,001 % vereischt wordt, onbruikbaar is. BENEDICT zelf heeft zijn methode hiervoor waarschijnlijk dan ook niet bedoeld, en had misschien alleen het klinische onderzoek van diabetische urine op het oog, toen hij voor urine-onderzoek zijn methode aanbeval.

Wegens de groote voordeelen, die BENEDICT's koper-oplossing biedt, is het evenwel niet te verwonderen, dat physiologen toch getracht hebben de gebreken, die BENEDICT's methode onnauwkeurig maken, uit den weg te ruimen, en zoo voor hun physiologisch-chemische reductie-bepalingen een methode te verkrijgen, die tegelijk voldoende nauwkeurig en snel uitvoerbaar is.

S. NAGASAKI [1]) heeft de methode van BENEDICT geschikt gemaakt voor de bepaling van het gehalte van normale urine aan glycose en andere koolhydraten. Deze onderzoeker heeft vooral den invloed van den tijd op den afloop der titratie nauwkeurig nagegaan, en komt op grond van zijn ervaringen tot het volgende uitgewerkte voorschrift:

10 cc. der koperoplossing van BENEDICT worden in een glazen kookkolfje (150 cc. inhoud; diameter hals 2 c.M.) op metaalgaas boven de vlam tot koken verhit, nadat ongeveer 5 gram Na_2CO_3 (gekrist.) en een weinig talk zijn toegevoegd; daarna wordt uit een buret 10 cc. urine in een straal in de kokende vloeistof gebracht, en het koken wordt **3** minuten voortgezet. (Is nu de blauwe kleur van de vloeistof geheel verdwenen, dan wordt de bepaling met verdunde urine op dezelfde wijze herhaald). Dan wordt, al naar de sterkte van de blauwe kleur, 2 of 1 cc., en eindelijk, als de reductie bijna volkomen is, droppelsgewijs urine toegevoegd, waarbij na elke toevoeging 1 minuut lang wordt gewacht. Het einde der reactie is bereikt, zoodra het blauw geheel uit de vloeistof is verdwenen, hetgeen het best te beoordeelen is door den inhoud van de kolf tegen een goed verlichten witten achtergrond te beschouwen. Wanneer

[1]) Onderzoekingen Physiol. Lab. Utrecht (**1915**), p. 216. En: Ned. Tijdschr. v' Geneesk. (**1915**, II), p. 1478.

de urine zoo weinig geconcentreerd is, dat 20 cc. ervan nog niet voldoende is om de 10 cc. koperoplossing te reduceeren, dan wordt de urine tot ½ van haar oorspronkelijke volumen (of zoo noodig nog sterker) ingedampt, en daarna de bepaling herhaald. — Nadat op deze wijze het reduceerend vermogen der urine bij benadering is bepaald, wordt bij een nieuwe portie van 10 cc. koperoplossing bijna de geheele hoeveelheid urine, die in de vorige proef was gebruikt, toegevoegd, en na 5 minuten doorkoken telkens nog 0,2 cc., en daarna droppelsgewijs, in tusschenruimten van ½ minuut, totdat al het blauw verdwenen is. — De geheele bepaling, de voorloopige en definitieve samen, neemt gewoonlijk niet meer dan 15 minuten in beslag. De vloeistof moet gestadig koken; doch niet te heftig, daar dan de indamping te sterk wordt. Alle titraties moeten ongeveer even lang duren (± 8 minuten, in geen geval langer dan 10 minuten).

NAGASAKI vermijdt dus den invloed van de oxydatie aan de lucht, door in een kookkolf met nauwen hals te koken. Door steeds ongeveer eenzelfde volumen urine (10—20 cc. als uitersten) toe te voegen en steeds 7—10 minuten te koken, werkt hij onder goede en constante voorwaarden van volumen (kookpunt, alkaliciteit) en kookduur. Inderdaad zijn op deze wijze alle bezwaren van BENEDICT'S methode opgeheven. En als men volgens NAGASAKI'S voorschrift te werk gaat, gelukt het na eenige oefening, het reduceerend vermogen van urine tot op 0,002 % nauwkeurig te bepalen, wanneer het van 0,200 tot 0,100 % bedraagt (dus 10—20 cc. voor de reductie der 10 cc. koperoplossing noodig is, wat voor de meeste normale urines het geval is).

Als men zijn eischen aan de nauwkeurigheid zeer hoog stelt, blijken ook binnen de door NAGASAKI aangegeven

grenzen nog kleine afwijkingen voor te komen, en wel weer in dien zin, dat men voor sterkere oplossingen relatief te hooge, voor zwakkere oplossingen relatief te lage waarden vindt. Wanneer ik b.v. met nauwkeurig afgewogen hoeveelheden van glycose purissima de juistheid der uitkomsten controleerde, bleek mij, dat de 10 cc. koperoplossing onder de door NAGASAKI aangegeven voorwaarden slechts dan door precies 20 mg glycose wordt gereduceerd, wanneer die glycose is opgelost in 14 cc. water; is ze opgelost in 10 cc. water, dan is 19,6 mg glycose reeds genoeg; is ze opgelost in 20 cc. water, dan is 20,6 mg glycose noodig. Indien men hiermee geen rekening houdt, en steeds de reductie met 20,0 mg glycose aequivalent stelt, maakt men dus bij de uiterste grenzen een fout van 0,003 à 0,004 %; b.v. voor een suikeroplossing van 0,196 % vindt men volgens NAGASAKI 0,200 %, en voor een suikeroplossing van 0,103 % vindt men 0,100 % als uitkomst. Als men deze fout zou willen ontgaan, zou men gebruik moeten maken van een tabel, zooals ik die door middel van een kleine reeks nauwkeurig bekende glycose-oplossingen door reductie-bepalingen, volgens NAGASAKI's methode verricht, samenstelde:

Sterkte der glycose-oplossing:	Afgelezen aantal cc. dezer glycose-oplossing, voor de reductie van 100 cc. koper-oplossing noodig:	Hieruit berekend aantal mg glycose, waardoor bij de gegeven verdunning de 10cc. koperoplossing wordt gereduceerd:
0,1953 %	10,05 cc.	19,6 mg
0,1639 %	12,1	19,8
0,1421 %	14,05	20,0
0,1238 %	16,3	20,2
0,1116 %	18,25	20,4
0,1030 %	20,0	20,6

Wanneer het er echter slechts om te doen is, de daling van het reduceerend vermogen van normale urine door gisting te bepalen (welke daling nooit meer dan 0,020—0,030 % bedraagt), kan men volstaan met — zooals NAGASAKI dan ook deed — de hoeveelheid reduceerende stof, in de benoodigde hoeveelheid (10—20 cc.) urine aanwezig, steeds met 20,0 mg glycose gelijkwaardig te stellen. Men maakt dan voor het glycose-gehalte der urine een fout, die nooit meer dan 3 % van 0,030 %, of 0,001 % hoogstens bedraagt.

Er is evenwel een geheel ander bezwaar aan de methode van BENEDICT-NAGASAKI verbonden, dat wèl dient te worden uit den weg geruimd; een bezwaar dat, zooals aanstonds zal blijken, juist door NAGASAKI's wijzigingen is ingevoerd, waar hij — door zachter te koken en niet meer in open schaal — de reactie bij grootere verdunning laat plaats hebben dan BENEDICT deed (welke laatste ook meestal sterkere suikeroplossingen titreerde). Indien men n.l. volgens NAGASAKI urine of zwakke glycose-oplossingen (0,150—0,100 %) titreert, scheidt zich na eenige minuten doorkoken in de blauwgroene urine of naast het witte cupro-rhodanaat roodbruin cupro-oxyde af, dat door de bruine of roodbruine tint, die het aan de vloeistof geeft, het waarnemen van het eindpunt der reactie zeer bemoeilijkt, soms zelfs geheel onmogelijk maakt.

Na zorgvuldig onderzoek is mij gebleken, dat de oorzaak van de afscheiding van het cupro-oxyde niet gelegen kan zijn in onzuiverheid van een der bestanddeelen van de koperoplossing, maar moet berusten op de te groote vermindering der concentratie van het rhodaankalium bij het titreeren volgens NAGASAKI.*) Dit was

*) Het lijkt mij zeer waarschijnlijk, dat hierbij *hydrolytische splitsing* van het sterk-verdunde cuprorhodanaat in het spel is. Voor deze

ook a priori wel te verwachten. Immers: het KCNS is door BENEDICT juist in zoodanige hoeveelheid (125 gram per liter) aan zijn reagens toegevoegd, dat het in staat is, de vorming van cupro-oxyde te beletten; en dat BENEDICT zelf de vloeistof door heftig koken in een open schaal steeds weer vrij sterk indampte, moet wel de reden zijn, waarom aan hemzelf 125 gram KCNS per liter voldoende bleek. — Inderdaad blijkt, dat extra toevoeging van 0,75—1,25 gram KCNS per 10 cc. koperoplossing de vorming van cupro-oxyde bij het tritreeren volgens NAGASAKI geheel voorkomt. Ik heb daarom dan ook BENEDICT's oplossing in zooverre gewijzigd, dat ik in plaats van 125 gram **250** gram KCNS per liter oploste.

Zooals te verwachten was, heeft deze wijziging geenerlei invloed op de absolute waarde der uitkomsten bij de titratie van glycose: de 10 cc. gewijzigde oplossing van BENEDICT wordt ook door 20 mg glycose gereduceerd.

Bij de titratie van urine is het voordeel der wijziging groot: in plaats van bruin en troebel te worden, blijft het mengsel van urine en koperoplossing tot het einde toe volkomen helder; en veel scherper is nu, boven een witten ondergrond, waar te nemen: hoe na het verdwijnen van het laatste spoor van groen de vloeistof een bruingele tint overhoudt, met niet meer groenen weerschijn

---

veronderstelling pleit reeds, dat de afscheiding van het koper-oxydule vooral plaats vindt bij het titreeren van verdunde glycose-oplossingen (die vrij van zout zijn) en van urine (die door de aanwezigheid van kreatinine het cuprorhodanaat voor een groot gedeelte in oplossing houdt), — terwijl daarentegen bij het titreeren van eveneens zwak reduceerend (maar door de voorbewerking steeds zoutrijk) bloeddecoct zich geen of nagenoeg geen koper-oxydule afscheidt. Titreert men een 0,1 % glycose-oplossing, nadat 10—20 % van een zout, b.v. Na_2SO_4, er aan is toegevoegd, dan blijkt door deze toevoeging van zout de vorming van het cupro-oxyde te kunnen worden tegengegaan.

dan de onvermengde urine. Het eindpunt bij de urine-titratie is wèl verschoven door de wijziging van het reagens; n.l. in dien zin, dat voor de totale zoowel als voor de rest-reductie een (1 à 5 %) lagere waarde gevonden wordt; vergelijkende bepalingen van de reductie der urine voor en na gisting doen echter de hoeveelheid glycose even groot vinden als met de oorspronkelijke vloeistof van BENEDICT. Welke van de twee waarden voor de restreductie de juiste is, valt bezwaarlijk te controleeren; ik ben geneigd te veronderstellen, dat de laagste waarde de juiste is, omdat het ontstaan van de bruine troebelheid door afscheiding van koper-oxydule (evenals waar die bij de titratie van verdunde glycose-oplossingen ontstaat) de laatste sporen van blauwgroene tint in de vloeistof geheel aan het oog onttrekt, en daardoor het eindpunt der titratie te vroeg doet aannemen: dus te hooge waarden doet vinden.

Tenslotte zij nog opgemerkt, dat ik de eerste hoeveelheid glycose-oplossing of bloeddecoct niet »in een straal« in de kokende koperoplossing liet stroomen, maar ook deze eerste hoeveelheid al *droppelsgewijs* (maar dan vrij snel droppelend) toevoegde. Het is mij n.l. gebleken, dat deze droppelsgewijze toevoeging van glycose-oplossing of onvergist bloeddecoct grooter praecipitaat van cuprorhodanaat veroorzaakt, het eindpunt der reductie scherper waarneembaar maakt, en daardoor beter kloppende uitkomsten geeft, dan de snellere toevoeging van de reduceerende vloeistof. (Bij het titreeren van weinig glycose bevattende urine en van vergist bloeddecoct blijft het cuprorhodanaat steeds in oplossing, en levert dus de droppelsgewijze toevoeging geen voordeel op).

Dank zij de toepassing der hierboven beschreven kleine

wijzigingen waren nu alle bezwaren van BENEDICT's methode overwonnen, en was het mij mogelijk, het reduceerend vermogen eener vloeistof (glycose-oplossing of urine), wanneer dit van 0.100 % tot 0.200 % bedroeg, tot op 0,002 % nauwkeurig te bepalen, en — als ik het gemiddelde nam van 2 of meer bepalingen — met nog kleinere fout.

Om de waarde der methode en mijn eigen ervaring daarin te controleeren, werden afgewogen (mij onbekende) hoeveelheden glycose aan door T. monosa van glycose bevrijde urine van bekend reduceerend vermogen toegevoegd: ik vond dan door titratie de toegevoegde hoeveelheid glycose nauwkeurig weer. Bij voorbeeld vond ik, toen uitgegaan werd van een urine van 0,113 % reduceerend vermogen, die met een glycose-oplossing van 0,94 % werd vermengd: 0,118 %, waar berekening gaf: 0,1186 %; en 0,170 %, waar berekening gaf 0,1683 %. Werd vervolgens de glycose bevattende urine met T. monosa vergist, dan vond ik weer precies 0,113 % terug: tevens een bewijs, dat de gistcellen goed werkten, en dat zij bij hun groei aan de vloeistof geen stoffen afstaan, die invloed hebben op het gehalte aan onvergistbare reduceerende stoffen ervan.

Daarna ging ik er toe over, het reduceerend vermogen te bepalen van het bloeddecoct, zooals ik dat (volgens de in hoofdstuk I uitvoerig beschreven methode) door koken van 2 liter bloed met 8 liter water (na neutraliseeren met normaal HCl) na filtreeren en indampen tot ± 500 cc. had verkregen. Dit bloeddecoct is nog niet geheel vrij van eiwitstoffen, en bevat ook nog splitsingsproducten van eiwitstoffen, die eerst door praecipitatie met PW volkomen kunnen worden verwijderd. De stoffen, die een biureetreactie geven, en daardoor

de titratie met BENEDICT's reagens onmogelijk zouden maken, kunnen uit het bloed door het koken bij de juiste zwak-zure reactie geheel verwijderd worden; vóór de zuivering met P W leent het bloed zich dus al goed voor de reductie-bepaling: een gelukkige omstandigheid, omdat het daardoor veel gemakkelijker is, het reduceerend vermogen van het bloeddecoct voor en na gisting te vergelijken (de gisting geschiedt in de nog niet geheel eiwit-vrije vloeistof veel sneller). De waarneming van het eindpunt der reductie is bij bloed veel gemakkelijker dan bij urine, omdat het bloeddecoct zelf nagenoeg kleurloos is, en dus een lichtgeel tot wit neerslag van cupro-rhodanaat ontstaat.

Door het bloeddecoct, indien noodig, met een gelijk volumen water te verdunnen of tot $^1/_2$ à $^1/_4$ van het oorspronkelijke volumen in te dampen, kon ik volgens BENEDICT-NAGASAKI het reduceerend vermogen tot op 0,001 à 0,002 % nauwkeurig bepalen, wanneer dit 0,030—0,400 % bedroeg: grenzen, die in het op deze wijze bereide bloeddecoct nooit werden overschreden.

De uitkomsten, die de reductie-bepalingen van het bloeddecoct van rund en paard gaven, zullen in de eerstvolgende hoofdstukken worden neergelegd.

Ter wille van de duidelijkheid laat ik hier de reductiemethode, zooals die door mij voor ingedampt bloeddecoct werd uitgevoerd, nog eens in haar geheel, kort samengevat, volgen:

Koperoplossing *): kopersulfaat . . . . . 18,000 gram
natriumcarbonaat. . . 200,— „

*) Het verdient aanbeveling, deze koperoplossing des winters niet in een onverwarmd vertrek te laten staan, daar anders een gedeelte der zouten (voornamelijk rhodaankalium) uitkristalliseert.

natriumcitraat . . . . . 200,— gram
kaliumrhodanaat . . **250,—** „
5 % $K_4Fe(CN)_6$ – opl. 5 cc.
gedest. water tot 1000 cc.

10 cc. dezer koperoplossing in een kookkolfje van 150 cc., na toevoeging van 5 gram Na_2CO_3 en een spoortje talk, tot koken verhitten; dan droppelsgewijs in ± 1 minuut 10 cc. bloeddecoct uit een buret toevoegen, en nog 3 minuten gestadig laten doorkoken. (Is de blauwe kleur dan geheel verdwenen, dan de bepaling met 1 : 2 verdund bloeddecoct herhalen.) Daarna, al naar de sterkte van de blauwe kleur, 2 of 1 cc. of minder toevoegen (steeds droppelsgewijs), met 1 minuut tusschenruimte tusschen de porties, totdat de blauwe kleur geheel weg is. (Is dit na toevoeging van 20 cc. nog niet het geval, dan de bepaling herhalen, nadat het bloeddecoct is ingedampt.) — Na deze benaderende bepaling: de definitieve. Zoodra een nieuwe portie van 10 cc. koperoplossing kookt: uit de buret droppelsgewijs ± 1 cc. minder bloeddecoct toevoegen dan bij de eerste proef noodig bleek; 4 minuten doorkoken; daarna elke 30 secunden 4—1 droppels toevoegen, tot verdwijnen van het laatste spoor van blauw (kolf beschouwen boven witten ondergrond). De totale kookduur moet 7—9 minuten zijn.

De 10 cc. koperoplossing wordt gereduceerd door 0,020 gram glycose. Is bij de titratie *n* cc. bloeddecoct gebruikt, dan is het gezochte reduceerend vermogen hiervan, in glycose uitgedrukt: $\frac{100}{n} \times 0{,}020$ of $\frac{2}{n}$ %.

Zie voor verdere wijziging der reductie-methode: hoofdstuk IX.

IV.

Het reduceerend vermogen van het bloeddecoct van rund en paard voor en na gisting.

In het voorgaande hoofdstuk werd er reeds op gewezen, dat men met het reagens van BENEDICT »ter quantitatieve bepaling van reduceerende suikers« in vloeistoffen als urine en bloed niet de koolhydraten alleen, doch de totale hoeveelheid direct-reduceerende stoffen bepaalt. Dit is, wanneer het om de bepaling van de suikers afzonderlijk te doen is, een groot bezwaar, dat evenwel allen reductie-methoden aankleeft: zoowel die waarbij alkalische koperoplossingen (FEHLING-SOXHLET, PAVY, LEHMANN-MAQUENNE, SCHOORL, BANG, BENEDICT, e.v.a.), als die waarbij alkalische kwikoplossingen (KNAPP, SACHSE) worden gereduceerd.

Bij de methoden van ALLIHN en van BERTRAND werkt men met overmaat van Fehling's proefvocht, en bepaalt het daarin neergeslagen cupro-oxyde gravimetrisch of titrimetrisch. Op deze wijze zouden, volgens sommige voorstanders dezer methoden, alleen de suikers eener oplossing en niet de overige reduceerende stoffen worden bepaald, daar al het door suiker gereduceerde koper neergeslagen, en al het door de overige stoffen gereduceerde in oplossing gehouden zou worden. Dit is echter niet juist: bloed zoowel als urine bevatten — ook na de meest zorgvuldige zuivering — naast de koolhydraten nog andere stoffen, die eenerzijds reduceerend werken

en afscheiding van koper-oxydule veroorzaken, anderer-zijds een gedeelte van het door de koolhydraten gereduceerde koper in oplossing houden (o.a. kreatinine). Wanneer men dit alles in aanmerking neemt, is het duidelijk, dat men volgens ALLIHN of BERTRAND in urine en bloed wel minder reduceerende stof vindt dan volgens SOXHLET, PAVY, BANG, BENEDICT, etc.; doch dat het bij gebruik van de methoden van ALLIHN en BERTRAND evenmin mogelijk is, uit het gevonden reductie-cijfer nauwkeurige gegevens omtrent het gehalte aan suiker te verkrijgen. Ook het gebruik van een tabel, die het bij de methoden van ALLIHN en van BERTRAND mogelijk maakt, een correctie aan te brengen voor het door de werking der loog bij het koken vernielde quantum suiker, kan deze methoden dus alleen maar geschikt maken voor nauwkeurige bepaling van zuivere suikeroplossingen, niet voor bepaling van het suikergehalte van urine of bloed.

Men vindt derhalve volgens alle reductie-methoden (volgens de ééne methode minder volledig, volgens de andere meer volledig) het gehalte aan suiker plus andere reduceerende stoffen van het bloed. — Tot deze zelfde slotsom zijn blijkbaar ook twee Duitsche onderzoekers: S. GUTMAN en O. ADLER gekomen, waar zij in hun voor eenige maanden verschenen artikel deze opmerking maken: »Trotz vieler Bemühungen ist bis heute noch keine Methodik zur Bestimmung des Blutzuckers geschaffen worden, die eine genaue Ermittelung der Glukose allein gestattet. Je nach dem Eiweissfällungsverfahren, nach der Reduktionsmethode zur Bestimmung des Traubenzuckers und nach der Zusammensetzung des Blutes können durch Purine, Kreatin, Kreatinin, ev. auch durch Aminosäuren, Peptone, und durch besondere Abbaustoffe im pathologischen Organismus (wie Tryptophan-

abkömmlinge, Homogentisinsäure, u.s.w.) Fehlerquellen bei der Bestimmung des Traubenzuckers entstehen« [1]).

Een goed middel om gegevens te verkrijgen over den aard en de hoeveelheid der afzonderlijke reduceerende stoffen, in het normale bloed aanwezig, is: de bepaling van het reduceerend vermogen voor en na gisting. Deze wijze van werken moet noodzakelijk worden gevolgd, wanneer men streeft naar een nauwkeurige bepaling van het glycose-gehalte van het bloed: het doel, waarvoor zoo velerlei methoden van »bloedsuikerbepaling« zijn aangegeven en toegepast.

Wanneer men de literatuur nagaat, vindt men door vele onderzoekers proeven vermeld, waarbij de reductie van het bloeddecoct voor en na gisting wordt vergeleken. Het bezwaar van al deze onderzoekingen is evenwel: dat daarbij (evenals in de kliniek bij het onderzoek van diabetische urine gebruikelijk is) gewone gist uit den handel (biergist of persgist) aan het bloeddecoct wordt toegevoegd. Deze handelsgist is een mengsel van allerlei soorten van gistcellen (saccharomyceten zoowel als torulaceae) met hun verscheidenheid van enzymen, en is bovendien meestal met allerlei stoffen en met bacteriën verontreinigd, welke laatste vernielende of beschadigende werking op de reduceerende stoffen van het bloed, en ook op de gistcellen, uitoefenen. Zoo worden b.v. pentosen door bacteriën in sommige omstandigheden (o.a. bij aanwezigheid van eiwitstoffen) gemakkelijk ontleed [2]). Daar komt nog bij, dat de persgistmassa — bij den groei en de ontleding der cellen — purinen en andere storende stoffen aan de oplossing afstaat [3]); de invloed hiervan

[1]) Gutman und Adler, Bioch. Zeitschr. **83**, 11 (1917).
[2]) Salkowski, Zeitschr. f. physiol. Chemie **30**, 478 (1900).
[3]) Mayer, Bioch. Zeitschr. **50**, 362 (1913).

op de restreductie zal vooral een hoogen graad bereiken, indien de persgist in vrij groote hoeveelheid (noodig om de gisting snel te doen plaats hebben en de bacterie-werking tot een minimum te beperken) aan het bloed wordt toegevoegd, of wanneer de gisting lang wordt voortgezet. Dat bij een dergelijke wijze van toepassing der gisting (waarbij bovendien nog onnauwkeurige reductie-methoden gebruikt werden) de verschillende onderzoekers tot zeer verschillende uitkomsten kwamen, behoeft geen betoog; en het is dan ook niet te verwonderen, dat de methode der gisting voor de bepaling van suiker in bloed slechts weinig ingang vond, en, door wie haar gebruikten, meestal spoedig weer als onbetrouwbaar werd verworpen.

Alle bezwaren, welke het werken met persgist oplevert, zijn met één slag overwonnen, wanneer men, in plaats van dit onberekenbare handelspreparaat, voor de gisting gebruik maakt van zuiver gekweekte gistcellen, en de te onderzoeken vloeistoffen na zorgvuldige sterilisatie daarmee ent. De verschillende saccharomyceten en torulaceae, die o. a. aanwezig zijn in de gist-preparaten, bij de bereiding van bier, wijnen, sterke dranken, enz. in gebruik, zijn door de mykologen zuiver gekweekt en nader onderzocht. 't Is vooral BEYERINCK geweest, die de gistende werking van vele dezer gistsoorten op allerlei koolhydraten nauwkeurig heeft nagegaan. En op grond van de specificiteit der enzymen van de verschillende gistsoorten heeft A. J. KLUYVER [1]) een methode uitgewerkt, waarmede in allerlei suikermengsels en handels-preparaten de hoeveelheid van elk der aanwezige suikers kan worden bepaald.

De »biochemische methode« van KLUYVER, waarbij de

---

[1]) Biochemische Suikerbepalingen. Diss. Delft, p. 59 en 119 (1914).

bij de vergisting van 1 cc. suikeroplossing gevormde hoeveelheid kooldioxyde wordt bepaald, is voor de bepaling van het suikergehalte van het bloed niet bruikbaar, wegens de geringe concentratie van de glycose en de nog veel geringere concentratie van de overige koolhydaten in het bloed.

In het vervolg van dit proefschrift zal blijken: hoe het mogelijk is, door de bepaling van het reduceerend vermogen van het bloeddecoct voor en na vergisting met verschillende soorten van zuiver gekweekte gistcellen een methode te verkrijgen, waarmee men nauwkeurig het gehalte aan glycose en aan andere, eventueel aanwezige, vergistbare reduceerende suikers van het bloed kan vinden.

Gelijk in den aanvang van hoofdstuk II is meegedeeld, heb ik voor de gisting van het bloeddecoct de werking van een drietal gistsoorten vergeleken, n.l.: Torula monosa, saccharomyces cerevisiae (een ondergist van »de Oranjeboom«) en Lactosegist 2. Van de vergistende werking dezer 3 gistsoorten op de verschillende, meest voorkomende suikers geeft de tabel op pag. 53 een overzicht.

De gistcellen werden gekweekt op mout-agar *), en om de 2—3 weken op een verschen bodem overgeënt. Op deze wijze behielden de enzymen hun werkzaamheid. Nu en dan controleerde ik deze werkzaamheid, door aan suikervrije, vloeibare voedingsvloeistoffen (vergiste urine of bloeddecoct; ook wel: oplossing van asparagine met de noodige anorganische zouten) bepaalde hoeveelheden van verschillende suikers toe te voegen, en

*) Samenstelling: agar-agar 2 gr., mout 5 gr., glycose 5 gr., op 100 c c water.

voor en na de suikertoevoeging het reduceerend vermogen er van te bepalen. Als ik daarna één platina-oogje vol gist toevoegde op 100—150 c c vloeistof, bleek na 18—24 uur, bij een temperatuur van 25—30°, 0,5 % glycose, saccharose, maltose of lactose door de gistsoort, die in staat is die suiker aan te tasten, steeds volledig te zijn vergist; terwijl van de suikers, die door de geënte gistsoort niet vergistbaar zijn, nog nagenoeg alles werd teruggevonden. Bij deze controle-proeven werd de voedingsvloeistof, voor de bepaling van de reductie na de gisting, slechts door filtratie door een vouwfilter van de gistcellen bevrijd.

Daar bij deze controle-proeven gebleken is, dat na de vergisting der vergistbare suikers weer precies het oorspronkelijke reduceerend vermogen der vloeistof werd teruggevonden, — en dat zelfs, wanneer de gisting nog 2 of 3 etmalen langer werd voortgezet, de restreductie nooit toe- of afnam —, kan ook worden besloten: *dat het gehalte van de vloeistof aan onvergistbare, reduceerende stoffen (de »rest-reductie«) door de gistcellen niet merkbaar gewijzigd wordt.* — Dit resultaat, voor de bepaling van het suikergehalte van urine en bloed van groot belang, is in strijd met de bevindingen van MAYER (vgl. p. 16 en 17), maar in overeenstemming met die van NAGASAKI [1]). De verklaring dezer tegenstrijdige uitkomsten ligt voor de hand: MAYER voegde 1,5 gram »Reinzuchthefe« aan 150 cc. glycose-oplossing toe, terwijl in de proeven van NAGASAKI en van mij per 100—150 cc. urine of bloed de hoeveelheid van één platina-oogje (= ± 15 mg) gist, als zijnde ruimschoots voldoende, nooit werd overschreden. Het komt er dus voor de betrouwbaarheid der bepaling

[1]) Onderzoekingen Physiol. Lab. Utrecht **(1915)**, p. 216. En: Ned. Tijdschr. v. Gen. (**1915**, II), p. 1478.

van het suikergehalte door reductie-bepaling voor en na gisting maar op aan: dat men een zuiver, sterk-werkzaam gistpreparaat gebruikt, aan de suikeroplossing de benoodigde (onvergistbare of niet-reduceerende) voedingsstoffen voor de gistcellen toevoegt, en alle bacterie-werking zorgvuldig uitsluit.

In de proeven, waarbij bloeddecoct vergist werd, was het suikergehalte daarvan wisselend tusschen 0,350 en en 0,001 %. Omdat bleek, dat in enkele gevallen na 18 uur gisting nog 0,001 à 0,004 % vergistbare suiker over was, die dan eerst na 24 uur geheel was verdwenen, heb ik de gisting van het bloeddecoct steeds ± 42 uur laten duren.

Bij de, in dit en in het volgende hoofdstuk te vermelden, reductie-bepalingen van het bloeddecoct was het mij niet om de absolute waarde der uitkomsten te doen, doch slechts om na te gaan: of in het runder- en paardenbloed naast glycose nog andere reduceerende stoffen voorkomen, en of daartoe vergistbare koolhydraten behooren. De hierna te noemen cijfers hebben dan ook in het geheel geen absolute waarde; want niet alleen werd voor deze proeven slechts onnauwkeurig rekening gehouden met het volumen van het ingedampte bloeddecoct (dat ± 1/4 van dat van het oorspronkelijke gedefibrineerde bloed bedroeg); maar bovendien werd het bloed eerst 1/2 tot 3 uur na het slachten van het dier in bewerking genomen (waardoor tengevolge van glycolyse een deel der glycose verdwenen was), en ging bij het affiltreeren van het stolsel en bij het overschenken steeds een klein deel van de reducerende stoffen verloren. Slechts dit is dus van deze cijfers te zeggen: dat erdoor wordt aangegeven, dat het gehalte van het oorspronkelijke gedefibrineerde bloed aan redu-

ceerende stoffen grooter is dan het $^1/_4$ gedeelte van de procentcijfers, voor die stoffen in het decoct gevonden.

Het bloeddecoct werd volgens de in hoofdstuk I, p. 41, beschreven methode bereid: uit 2 liter gedefibrineerd bloed (veneus of gemengd arteriëel-veneus) kreeg ik zoo ± 500 cc. zwak zuur reageerend decoct, dat nog zoo veel eiwitresten bevatte, dat deze, zonder de reductie-bepaling te storen, toch voldoende waren voor een snelle gisting. Na bepaling van het reduceerend vermogen (volgens methode p. 74) werd de rest van dit decoct gesteriliseerd door 10 minuten koken in een steriele, van een watteprop voorziene, kolf, na afkoelen met 3—4 platinaoogjes vol gistcellen geënt, en 42 uur boven op de broedstoof van 38° geplaatst. Daarna werd de vloeistof door aanvulling met gedistilleerd water weer tot haar oorspronkelijke volumen teruggebracht, gefiltreerd, en op nieuw getitreerd.

Het bloeddecoct had vóór de gisting een reduceerend vermogen, dat — in ± 50 proeven met bloed, van verschillende runderen en paarden afkomstig — wisselde tusschen **0,190** en **0,377** %; een schommeling, die voornamelijk moet hebben afgehangen van den verschillenden duur der glycolyse. In alle proeven bleek na 42 uur gisting met T. monosa (dus na verwijdering der glycose alleen) nog een restreductie van **0,060—0,082** % te zijn overgebleven. Er zijn dus in het op deze wijze bereide bloeddecoct ongetwijfeld naast glycose nog andere reduceerende stoffen aanwezig, en wel in een (op het oorspronkelijke volumen van het bloed omgerekend) gehalte van *ruim* **0,015—0,021** %.

Het eerste doel was nu: na te gaan, of met behulp van de reductie-methode ook iets naders omtrent den aard dezer restreductie kon worden vastgesteld.

Het meest voor de hand ligt, te veronderstellen, dat de met PW praecipiteerbare stoffen, die het bloeddecoct nog bevat, bij het koken met de alkalische koperoplossing reduceerend daarop werken. Wanneer het bloeddecoct door middel van PW (zie p. 41 en 42) volkomen van eiwitstoffen wordt bevrijd, blijkt de reductie tot op ongeveer de helft te dalen: **0,030—0,055** %. Of — weer op het oorspronkelijke bloedvolumen omgerekend —: het met PW gezuiverde normale runder- en paardenbloed bevat, behalve glycose, nog *ruim* **0,008—0,014** % reduceerende stoffen.

In ronde cijfers: op 100 cc. van eiwit bevrijd bloed komen, behalve glycose, nog andere reduceerende stoffen voor, welke te zamen zooveel reduceerend vermogen hebben als 10—15 mg glycose. — Deze restreductie moet wel voor een gedeelte berusten op de steeds in het bloed aanwezige reduceerende stoffen: kreatinine en glycuronzuur.*) Echter: deze stoffen zijn normaliter slechts in zoo uiterst geringe hoeveelheid aanwezig, en hebben daarenboven een zoo gering reduceerend vermogen, dat zij te zamen nog maar voor een klein gedeelte van de restreductie kunnen worden aansprakelijk gesteld. — Waarschijnlijk is, op grond o. a. al van veel door andere onderzoekers gedane waarnemingen, dat er ook nog andere reduceerende *koolhydraten* dan glycose in het bloed aanwezig zijn. Op p. 51 kwam ik, bij de vergelijking van het reduceerend en rechtsdraaiend vermogen van de door verzeeping der benzoylesters verkregen bloedsuiker-oplossing, tot

*) Glycuronzuur werkt slechts reduceerend, in zooverre het als 't vrije zuur (?) of als losse verbinding voorkomt. Acidum uricum komt waarschijnlijk in het bloed van herbivoren in het geheel niet voor. [Vgl. COHEN TERVAERT: Bepaling van urinezuur in urine en bloed, Diss. Utrecht, p. 87 (1917).]

de conclusie: dat het bloed naast glycose nog een of meer koolhydraten moet bevatten. En ook de uitkomsten der phenylhydrazine-reacties bewezen de aanwezigheid van nog andere reduceerende koolhydraten dan glycose; o. a. liet zich bij het onderzoek der osazonkristallen telkens weer vermoeden: dat het bloed lactose zou bevatten.

Indien lactose in het bloed aanwezig is, moet dit bij de reductie-bepalingen o. a. daaruit blijken, dat de rest-reductie na gisting met lactosegist kleiner is dan na gisting met T. monosa. Voor *koeienbloed* vond ik de volgende cijfers:

Reductie koeien-bloeddecoct vóór gisting:	Reductie na vergisting met:		Reductie, berus-tend op lactose:
	T. monosa:	lactosegist:	
0,297 %	0,071 %	0,064 %	**0,007 %**
0,216	0,082	0,070	**0,012**
0,304	0,079	0,070	**0,009**
0,288	0,079	0,067	**0,012**

In alle proeven dus een verschil van 0,007—0,012 % in dezelfde richting, hetgeen duidelijk wijst op de aanwezigheid van een door lactosegist wèl, door T. monosa niet vergistbare reduceerende stof. Dat deze stof lactose is, wordt in verband met de uitkomsten van het osazon-onderzoek waarschijnlijk, en door de hieronder te bespreken controle-proeven tot zekerheid gemaakt. Het reduceerend vermogen van het koeienbloed berust dus voor ruim $^1/_4 \times$ 0,007 à $^1/_4 \times$ 0,012 % of voor ruim 0,002—0,003 % op lactose. Neemt men in aanmerking, dat lactose tegenover de koperoplossing van BENEDICT ongeveer $^3/_5 \times$ de reductie van eenzelfde hoeveelheid glycose vertoont, dan vindt men dus: *per 100 cc. koeienbloed ruim 3—5 mg lactose.*

Het was nu van belang na te gaan, of ook *stierenbloed* een dergelijk, op de aanwezigheid van lactose wijzend, verschil oplevert. Dit bleek inderdaad het geval te zijn. Omdat echter de verschillen bij het stierenbloed nog kleiner waren dan bij het koeienbloed, was het noodig, vooral bij het stierenbloed talrijke controle-proeven in te stellen: 1°: om na te gaan, of soms door de beide gistsoorten reduceerende, onvergistbare stoffen in verschillende mate geassimileerd werden; 2°: om de volledigheid der gisting scherp te controleeren; 3°: om uit te maken of naast glycose en lactose misschien nog andere vergistbare reduceerende suikers aanwezig zijn.

Ad 1um: Indien urine, of van lactose (door gisting) bevrijd en weer met glycose vermengd bloeddecoct, vergist werd, vond ik na gisting met lactosegist nooit kleiner restreductie dan na gisting met T. monosa; waar bij versch bloed na vergisting met lactosegist lager restreductie gevonden wordt, kan dit dus niet door het verdwijnen van reduceerende stof door assimilatie (door de lactosegist) veroorzaakt zijn.

Ad 2um et 3um: Bij het stierenbloed werden de proeven meestal zoo ingericht, dat 3 verschillende porties van het bloeddecoct eerst resp. met T. monosa, S. cerevisiae en lactosegist werden vergist (kolommen, in de tabel op p. 86 met T, C en L aangeduid), en daarna de met T vergiste vloeistof in 3 porties verdeeld voor 2de gisting *) met resp. T, C en L (kolommen TT, TC en TL in de tabel), de met C vergiste vloeistof in 2 porties verdeeld voor de 2de gisting met C en L (kolommen CC en CL), en de met L vergiste vloeistof

*) Het spreekt van zelf, dat vóór elke 2de enting eerst door filtratie de eerste gist verwijderd was, en de vloeistof opnieuw gesteriliseerd.

Reductie stierenbloed-decoct vóór gisting:	Reductie na gisting:										Reductie berustend op galactose, maltose, melibiose:	Reductie berustend op lactose:
	T	TT	TC	TL	C	CC	CL	L	LC	LL		
0,204 %	0,065%	0,065%	—	0,058%							—	**0,007 %**
0,281	0,081	0,080	—	0,073							—	**0,007**
0,253	0,062	0,060	0,060%	0,054	0,063%	0,062%	0,055%	0,056%	0,055%	0,054%	0,001 %	**0,006**
0,212	0,060	0,059	0,059	0,055	—	0,059	0,058				0,000	**0,001—0,004**
0,192	0,068	0,067	—	0,062							—	**0,005**
0,252	0,068	0,068	0,068	0,067	0,067	0,067	0,065	0,060	—	0,060	0,000	**0,001—0,008**
0,244	0,062	0,061	—	0,057				0,059	—	0,058	—	**0,003—0,004**
0,208	0,076	0,074	0,074	0,067	0,074	0,073	0,067	0,070	0,068	0,068	0,000 - 0,002	**0,006—0,007**
0,231	0,061	0,060	0,060	0,057	0,060	0,060	0,056	0,056	—	0,057	0,000	**0,003—0,004**
0,296	0,070	0,070	0,069	0,066				0,066	—	0,066	0,001	**0,003**

idem (kolommen LC en LL). Op deze wijze kon de volledigheid der gisting worden gecontroleerd, en kon worden nagegaan, of de daling der restreductie door lactosegist nog op andere stoffen dan lactose kon berusten.

In de tabel (p. 86) kan men zien, dat de gisting na 42 uur volledig is; want indien nog eens met dezelfde gistsoort vergist wordt, verandert de restreductie niet meer (in enkele gevallen daalt zij 0,001 of 0,002 %, of stijgt 0,001 %; maar dit moet wel aan waarnemingsfouten worden toegeschreven). Door S. cerevisiae worden uit het bloeddecoct niet meer reduceerende stoffen vergist, dan door T. monosa; het bloed bevat dus geen galactose, maltose of melibiose (tenzij sporen van minder dan 0,001 %). Hieruit volgt, dat de vermindering, welke de restreductie (na gisting met T. monosa waargenomen) door nàgisting met lactosegist ondergaat, moet berusten op de aanwezigheid van lactose in het bloed. Ook de met S. cerevisiae vergiste portie bloeddecoct blijkt, in overeenstemming hiermee, door nàgisting met lactosegist een vermindering in reduceerend vermogen te ondergaan, en — althans in de meeste proeven — te dalen tot ongeveer de restreductie, die de kolom LL aanwijst.

De hoeveelheid lactose, die ik in deze proeven in het bloed van verschillende stieren vond, heeft in het decoct een reduceerend vermogen van 0,001—0,007 %, in de meeste gevallen: 0,004 %; *in het stierenbloed komt dus 1 à 2 mg lactose per 100 cc. voor*, een uiterst geringe hoeveelheid, die zich — zelfs in het ingedampte decoct — slechts even buiten de grenzen der bepalingsfouten uitstrekt.

Een ander plantenetend zoogdier, waarvan ik bloed in voldoende hoeveelheid kon verkrijgen om de aanwezigheid van lactose erin na te gaan, is het *paard*. Het

bloeddecoct hiervan werd weer op dezelfde wijze uit 2 liter paardenbloed bereid en tot $^1/_2$ liter ingedampt; in de eerste drie proeven (zie onderstaande tabel) was het bloed gedefibrineerd; in de 4de proef was het door kalium-oxalaat voor stolling bewaard.

Reductie paarden-bloeddecoct vóór gisting:	Reductie na vergisting met			Reductie, berustend op galactose, maltose, melibiose:	Reductie, berustend op lactose:
	T. monosa:	S. cerevisiae:	lactosegist:		
0,279 %	0,082 %	0,081 %	0,073 %	0,001 %	**0,008 %**
0,240	0,074	0,075	0,069	0,000	**0,006**
0,232	0,073	0,073	0,066	0,000	**0,007**
0,267	0,069	0,068	0,057	0,001	**0,011**

Ook in paardenbloed zijn dus, naast glycose, geen andere vergistbare, reduceerende suikers te vinden dan lactose. Ruim 0,006—0,011 % reductie van het decoct berust op lactose, of 0,0015—0,003 % van het bloed; waaruit we vinden: *in paardenbloed bevindt zich ruim 2,5 à 5 mg lactose per 100 cc.* (Het geslacht dezer paarden is mij niet bekend.)

De reductie-bepalingen voeren dus tot hetzelfde resultaat als de reacties met phenylhydrazine: **lactose is een constant voorkomend bestanddeel van het normale bloed van rund en paard; behalve glycose en lactose komen in dat bloed geen vergistbare, reduceerende suikers voor.**

Door deze proeven wordt allerminst uitgesloten, dat tijdens digestie nog andere vergistbare reduceerende suikers dan glycose en lactose in het runder- en paardenbloed kunnen voorkomen; want ik heb uitsluitend het bloed

onderzocht van slachtdieren, die in de laatste uren geen voedsel hadden gebruikt.

Toen ik lactose vond in het bloed van de koe, was mijn eerste veronderstelling, dat de aanwezigheid der lactose met de lactatie-functie zou samenhangen; vooral aangezien in den tijd, waarin ik deze proeven verrichtte, dikwijls koeien geslacht werden die nog melk gaven. De waarneming, dat ook de stier *) lactose in zijn bloed heeft, toont aan, dat de aanwezigheid van lactose in het bloed met nog andere stofwisselingsprocessen moet samenhangen, — al is het wel waarschijnlijk, dat tijdens de lactatie-periode het lactose-gehalte van het bloed hooger dan normaal zal zijn.

Het zou mogelijk zijn, dat het voorkomen van lactose in het bloed van runderen en paarden samenhangt met het feit, dat deze dieren planteneters zijn; immers een gedeelte van de stoffen, die tot de plantaardige »glycosiden« gerekend worden, zijn galactosiden. Het zou in dit verband belangwekkend zijn, na te gaan, of in het bloed van langen tijd uitsluitend met vleesch gevoede dieren lactose voorkomt. Daar ik niet in de gelegenheid was, een voldoende hoeveelheid bloed van carnivoren te verkrijgen, kan ik hierover geen gegevens meedeelen. — Zie verder het onderzoek van menschenbloed (hoofdst. X).

*) De onderzochte stieren waren alle ouder dan 2 jaar; bij geen ervan kan dus voeding met melk oorzaak zijn van de aanwezigheid van lactose in het bloed.

V.

Hydrolyse der koolhydraten van runderbloed door koken met verdunde zuren.

In het vorige hoofdstuk kwam ik tot het resultaat: dat het bloed van herbivore zoogdieren naast glycose, na zuivering door phosphorwolfraamzuur, nog ruim 0,008—0,014 % reduceerende stoffen bevat; dat van deze restreductie ruim 0,001—0,003 % op rekening van lactose moet worden gesteld; en dat overigens geen door de gebruikte gistsoorten vergistbare, reduceerende koolhydraten in het bloed aanwezig zijn. De positieve uitkomst der phenylhydrazine-reactie in het met lactosegist vergiste bloed leerde (hoofdst. II), dat naast glycose en lactose nog een suiker met een vrije carbonylgroep (dus met reduceerend vermogen) in het bloed voorkomt. Het is dus zeker, dat de na vergisting met lactosegist gevonden restreductie (0,006—0,012 %) ten deele op een onvergistbare, reduceerende suiker berust.

Ten einde over den aard van deze suiker (Y) nadere gegevens te verkrijgen, heb ik onderzocht hoe de restreductie van het bloeddecoct verandert door koken met verdunde zuren, en door opvolgende gisting met T. monosa. Op deze wijze toch moest kunnen worden nagegaan, of in het bloed koolhydraten aanwezig zijn, die door het koken met zuur hydrolytische splitsing ondergaan (en dus de restreductie doen toenemen), en of bij die hydrolytische splitsing glycose of een door T. monosa niet-vergistbare suiker gevormd wordt. Deze proeven

werden aanvankelijk genomen met het doel, nadere zekerheid te verkrijgen over het al of niet voorkomen van iso-maltose in het bloed. Deze suiker, door LEMAIRE [1]) in de urine van den mensch aangetoond, bepaalde NAGASAKI [2]) daarin, vertrouwende op de juistheid der opvatting, dat iso-maltose reeds door koken met citroenzuur, dextrine eerst door koken met zoutzuur gehydrolyseerd zou worden; en inderdaad wijzen NAGASAKI's goed kloppende uitkomsten (door gisting met T. monosa gecontroleerd) er op, dat deze wijze van bepalen van iso-maltose in urine betrouwbaar zou zijn.

Ik gebruikte voor de hydrolyse steeds het met T. monosa of met lactosegist vergiste en daarna met PW gezuiverde bloeddecoct. Om de uitkomsten met die van het vorige hoofdstuk vergelijkbaar te maken, heb ik het reduceerend vermogen weer aangegeven, zooals dat geweest zou zijn in het tot $^1/_4$ van het bloedvolumen ingedampt decoct (wegens het geringe reduceerend vermogen na de zuivering met P W moest voor de titratie het decoct nog veel verder worden ingedampt). Indien men de in de tabellen staande cijfers op het oorsponkelijke volumen van het bloed wil omrekenen, heeft men dus weer het $^1/_4$ gedeelte ervan als minimumwaarde te nemen.

Het bloeddecoct werd in de eerste proeven gedurende 7 minuten met 1 % HCl, of gedurende 10 minuten met 2 % citroenzuur in een kookkolf op een kopergaasje boven een kleine vlam gekookt, en terstond daarna onder de waterkraan weer afgekoeld. Na neutraliseeren en aanvullen tot het oorspronkelijke volumen werd weer het reduceerend vermogen bepaald, en na gisting met T. monosa nog eens:

[1]) l. c.
[2]) l. c.

Reductie runderbloeddecoct vóór gisting:	Reductie na vergisting met T. monosa:	Reductie na zuivering met PW:	Reductie na hydrolyse, *a*: vóór en *b*: na gisting met T. monosa:	Bij de hydrolyse gevormde hoeveelheid monose:	Zuur, door middel waarvan de hydrolyse geschiedde:
0,256 %	0,072 %	0,036 %	*a* 0,042 % *b* 0,038 %	0,004 %	2 % citroenzuur
0,270	0,081	0,047	*a* 0,049 *b* 0,046	0,003	»
0,190	0,066	0,036	*a* 0,040 *b* 0,037	0,003	»
—	0,069	0,032	*a* 0,035 *b* 0,032	0,003	»
0,227	0,078	0,043	*a* 0,051 *b* 0,044	0,007	1 % zoutzuur
0,245	0,080	0,049	*a* 0,059 *b* 0,049	0,010	»
	Red. na vergisting met lactosegist:				
0,211	0,066	0,043	*a* 0,051 *b* 0,042	0,009	»
0,226	0,060	0,038	*a* 0,044 *b* 0,037	0,007	»

Men ziet uit deze cijfers, dat, zoowel na 10 minuten koken met 2 % citroenzuur als na 7 minuten koken met 1 % HCl, het reduceerend vermogen van het vergiste bloeddecoct met enkele duizendste procenten toeneemt, en wel tengevolge van het ontstaan van een reduceerende stof, die door T. monosa weer geheel of nagenoeg geheel wordt vergist*); er wordt dus bij de hydrolyse uit hoogere koolhydraten een monose gevormd, waarschijnlijk glycose. Wanneer het bloeddecoct eerst met lactosegist

*) Hieruit valt ook te besluiten, dat het met PW gezuiverde runderbloeddecoct glycuronzure esters hoogstens in zoo geringe hoeveelheid bevat, dat er geen rekening mee behoeft te worden gehouden.

was vergist, in plaats van met T. monosa, steeg toch door het koken met zuur het reduceerend vermogen evenveel. Het al of niet aanwezig zijn van lactose heeft dus bij de hydrolyse van het suikermengsel geen merkbaren invloed; dit is ook niet te verwonderen, daar lactose tegen koken met zuren zeer resistent is: door koken met citroenzuur wordt het in 't geheel niet, door koken met minerale zuren eerst na eenige uren tot galactose + glycose ontleed.

In urine vond NAGASAKI, dat — naast de door koken met citroenzuur in 2 moleculen glycose uiteenvallende iso-maltose — ook een dextrineachtige stof was aan te toonen, die door koken met citroenzuur niet, door koken met zoutzuur wel reduceerende eigenschappen krijgt, doch geen glycose levert. Deze verschillen in eigenschappen stelden hem in staat, zoowel iso-maltose als dextrine in de urine te bepalen. (NAGASAKI neemt daarbij aan, dat na 10 minuten koken met 1 % HCl, op het zandbad, alle dextrine gesplitst is).

Bij de hydrolyse van vergist bloeddecoct kreeg ik andere uitkomsten. Immers, uit de tabel op p. 92 blijkt, dat weliswaar door HCl meer reduceerende stof wordt gevormd dan door citroenzuur, doch dat in alle gevallen niets dan glycose ontstaat. Dit zou er op wijzen, dat de dextrine-achtige stoffen van het vergiste bloed bij de hydrolyse geen andere reduceerende stoffen dan glycose leveren, en dus van anderen aard zijn dan de gom uit urine.

Het is echter van belang te bedenken, dat de gom uit urine en dierlijke organen volgens LANDWEHR [1]) en LEMAIRE [2]) bij koken met verdunde zuren slechts langzaam

[1]) Centralbl. für die mediz. Wissensch. (**1885**), p. 369.
[2]) Diss. Utrecht, p. 29 en 36 (1895).

	Reductie runderbloed-decoct vóór gisting.	Reductie na vergisting met T. monosa	Reductie na zuivering met PW.	Reductie na 10, 20, 30 en 40 minuten hydrolyse; *a*: vóór en *b*: na gisting met T. monosa.				Controle: 30 minuten zonder zuur gekookt.	Hoeveelheid monose, gevormd bij hydrolyse gedurende:				Zuur, door middel waarvan de hydrolyse plaats had.
				10 min.	20 min.	30 min.	40 min		10 min.	20 min.	30 min	40 min.	
I	0,266 %	0,080 %	0,051 %	*a* 0,058 % *b* 0,050 %	*a* 0,064 % *b* 0,051 %				0,008 %	0,013 %			1 % zoutzuur
II	0,216	0,076	0,045	*a* 0,051 *b* 0,046	*a* 0,054 *b* 0,046				0,005	0,008			»
III	0,233	0,087	0,044	*a* 0,049 *b* 0,043	*a* 0,052 *b* 0,043	*a* 0,054 *b* 0,044	*a* 0,055 *b* 0,043		0,006	0,009	0,010	0,012	»
IV	0,211	0,066 *)	0,043	*a* 0,051 *b* 0,042	*a* 0,055 *b* 0,042				0,009	0,013			»
V	0,226	0,060 *)	0,038	*a* 0,044 *b* 0,037	*a* 0,050 *b* 0,038	*a* 0,053 *b* 0,037			0,007	0,012	0,016		»
VI	0,230	0,074	0,049	*a* 0,053 *b* 0,049	*a* 0,056 *b* 0,050	*a* 0,057 *b* 0,050	*a* 0,058 *b* 0,049		0,004	0,006	0,007	0,009	2 % citroenzuur
VII	0,292	0,072	0,036	*a* 0,041 *b* 0,037	*a* 0,043 *b* 0,037			*a* 0,036 *b* 0,036	0,004	0,006			»
VIII	0,213	0,081	0,048	*a* 0,049 *b* 0,047	*a* 0,049 *b* 0,048	*a* 0,049 *b* 0,048	*a* 0,050 *b* 0,048	*a* 0,048 *b* 0,048	0,002	0,001	0,001	0,002	»
IX	—	—	0,054	*a* 0,059 *b* 0,053	*a* 0,062 *b* 0,054	*a* 0,065 *b* 0,055	*a* 0,068 *b* 0,054	*a* 0,055 *b* 0,054	0,006	0,008	0,010	0,014	»
X	—	—	0,034	*a* 0,038 *b* 0,034	*a* 0,039 *b* 0,034	*a* 0,039 *b* 0,035		*a* 0,034 *b* 0,034	0,004	0,005	0,004		»
XI	—	—	0,050	*a* 0,057 *b* —	*a* 0,061 *b* —	*a* 0,064 *b* —			0,007	0,011	0,014		»
XII	—	—	0,043	*a* 0,047 *b* 0,043	*a* 0,046 *b* 0,043	*a* 0,046 *b* 0,043		*a* 0,043 *b* 0,043	0,004	0,003	0,003		»
XIII	—	—	0,032	*a* 0,036 *b* 0,033	*a* 0,037 *b* 0,032	*a* 0,039 *b* 0,032		*a* 0,033 *b* 0,033	0,003	0,005	0,007		»
XIV	—	—	0,040	*a* 0,045 *b* 0,039	*a* 0,047 *b* 0,040	*a* 0,048 *b* 0,040	*a* 0,050 *b* 0,040	*a* 0,040 *b* 0,040	0,006	0,007	0,008	0,010	»

*) met lactosegist vergist.

in reduceerende suiker wordt omgezet, — veel langzamer dus dan saccharose, iso-maltose, glycogeen en de eigenlijke dextrinen, voor welker volledige hydrolyse 7 minuten koken met 1 % HCl reeds voldoende is. In overeenstemming hiermee was mijn bevinding (p. 50), dat ook de uit bloed te bereiden gom eerst na ± 30 minuten koken met 1 % HCl reduceerend vermogen krijgt. Het is dus duidelijk, dat de hydrolyse van het bloeddecoct langer moet worden voortgezet, daar het toch mogelijk is, dat langduriger hydrolyse wel een aantoonbare hoeveelheid onvergistbare suiker uit de gom van het bloed doet ontstaan. In de tabel op p. 94 en 95 zijn de uitkomsten vermeld van hydrolyse bij langeren kookduur. Om het indampen der vloeistof tegen te gaan, vulde ik nu en dan met water aan, of maakte gebruik van een recht opstaanden koeler op de kookkolf. In enkele gevallen, waarin ik genoeg bloeddecoct daarvoor had, werd één portie ter controle ook zonder toevoeging van zuur 30 minuten gekookt.

In alle proeven vertoont de restreductie een stijging, die (met uitzondering van proef VIII, X en XII) nog toeneemt met den kookduur; na 40 minuten is deze stijging waarschijnlijk nog niet geheel ten einde. Daar na gisting met T. monosa de bij de hydrolyse ontstane reduceerende stof weer geheel verdwijnt, moet worden besloten, dat slechts glycose is ontstaan; een enkele maal heb ik in de vloeistof na koken met phenylhydrazine glycosazon-kristallen kunnen aantoonen. En uit het feit, dat na de gisting met T. monosa steeds weer hetzelfde reduceerend vermogen, dat het decoct vóór de hydrolyse vertoonde, werd teruggevonden, — en nooit een lagere waarde —, mag worden besloten, dat deze glycose ontstaan is uit oorspronkelijk niet-reduceerende koolhydraten

(zooals glycogeen, dextrine, saccharose), en niet afkomstig kan zijn van koolhydraten, die ook vóór de hydrolyse tot de restreductie bijdroegen (zooals ev. isomaltose). Dat lactose ook na langer koken met HCl geen merkbaren invloed kan hebben gehad op de veranderingen in het reduceerend vermogen van het bloeddecoct, blijkt uit proef IV en V: daarin was te voren door lactosegist de lactose verwijderd, en toch zijn de uitkomsten dezelfde als in proef I—III.

Deze proeven hebben dus geleerd, dat de bij het koken met zuur ontstane glycose voor een belangrijk gedeelte afkomstig moet zijn van een langzaam hydrolyseerbaar polysaccharide van het vergiste bloeddecoct. In hoeverre hieruit met zekerheid iets kan worden afgeleid aangaande den aard der tot het bloed zelf behoorende gom, zal aan het eind van dit hoofdstuk worden besproken.

Om uit te maken, of het vergiste bloeddecoct naast de polysacchariden nog lagere hydrolyseerbare suikers (b.v. saccharose of iso-maltose) bevat, heb ik ook nog de boven beschreven proeven herhaald met bloeddecoct, dat ik te voren door behandeling met 80 % alcohol volkomen van polysacchariden had bevrijd. Het decoct was daarbij weer eerst met T. monosa of met lactosegist vergist, en door PW gezuiverd. Verdere bijzonderheden over de wijze, waarop deze proeven werden ingericht, vermeldt de tabel op p. 98.

Het resultaat dezer proeven is, voor zoover de porties A betreft, weer hetzelfde als vroeger: vorming van een monose, en wel des te meer, naarmate langer met HCl gekookt is. Wanneer echter hetzelfde bloeddecoct na verwijdering der polysacchariden met 1 % zoutzuur gekookt wordt, neemt het reduceerend vermogen, zelfs na 3 kwartier koken, niet of nauwelijks meer toe.

Reductie runderbloeddecoct vóór hydrolyse; A: vóór, en B: na behandeling met 80 % alcohol	Reductie na 15, 30 en 45 minuten hydrolyse met 1 % HCl; *a*: vóór en *b*: na gisting met T. monosa.			Hoeveelheid monose, gevormd bij hydrolyse gedurende:		
	15 min.	30 min.	45 min.	15 min.	30 min.	45 min.
A 0,036 %	*a* 0,040 % *b* —	*a* 0,043 % *b* —	*a* 0,045 % *b* —	0,004 %	0,007 %	0,009 %
B 0,034 %	*a* 0,034 *b* —	*a* 0,035 *b* —	*a* 0,034 *b* —	0,000	0,001	0,000
A 0,048	*a* 0,050 *b* 0,048	*a* 0,058 *b* 0,049	*a* 0,062 *b* 0,049	0,002	0,009	0,013
B 0,043	*a* 0,043 *b* —	*a* 0,043 *b* —	*a* 0,042 *b* —	0,000	0,000	0,000
A 0,041	*a* 0,048 *b* 0,042	*a* 0,053 *b* 0,041	*a* 0,055 *b* 0,042	0,006	0,012	0,013
B 0,038	*a* 0,041 *b* 0,040	*a* 0,041 *b* 0,039	*a* 0,041 *b* 0,039	0,001	0,002	0,002
A 0,039	*a* 0,045 *b* 0,037	*a* 0,050 *b* 0,039	*a* 0,055 *b* 0,037	0,008	0,011	0,018
B 0,034	*a* 0,034 *b* 0,033	*a* 0,035 *b* 0,034	*a* 0,035 *b* 0,034	0,001	0,001	0,001

Wat kan nu uit de in dit hoofdstuk beschreven proeven met betrekking tot de koolhydraten van het bloed worden besloten?

In positieven zin: niets met zekerheid. In negatieven zin: wèl een en ander.

Wanneer men vergist bloed onderzoekt, moet altijd groote voorzichtigheid in acht genomen worden bij het trekken van conclusies; immers: het zou mogelijk zijn, dat stoffen, die men in het bloed na de gisting aantreft, van de gistcellen en niet van het bloed afkomstig zijn. Daarom heb ik bij de bereiding van osazon uit vergist bloed mij ervan overtuigd, dat de gistcellen aan een

kunstmatige, bekende voedingsvloeistof geen stoffen afstaan, die met phenylhydrazine in azijnzure oplossing een krystallijn praecipitaat geven (zie p. 55). En evenzoo heb ik bij de reductie-bepalingen door controle-proeven nagegaan, dat de gistcellen op het gehalte aan onvergistbare reduceerende stoffen van bloed, urine en andere vloeistoffen geen merkbaren invloed hebben (zie p. 80). Voor reacties met phenylhydrazine en voor reductie-bepalingen is het bloeddecoct na gisting met zuiver-gekweekte gistcellen dus nog goed bruikbaar.

Iets anders is het echter bij de hydrolyse door koken met verdunde zuren. Het is niet geoorloofd, de veranderingen, die het vergiste bloeddecoct na koken met zuren in zijn reduceerend vermogen vertoont, zonder meer aan hydrolyse van stoffen van het bloed zelf toe te schrijven; want ook de gistcellen bevatten polysacchariden, die tijdens de gisting zonder twijfel voor een deel in de oplossing overgaan. En evenmin is het dus geoorloofd, uit de uitkomsten van phenylhydrazine-reacties of van vergistingsproeven, welke met het na gisting gehydrolyseerde bloed zijn genomen, positieve conclucies aangaande de bloedbestanddeelen af te leiden.

Microscopisch kan men zich door glycogeen-reacties van de aanwezigheid van glycogeen in de gistcellen overtuigen. En wanneer ik vergiste Hayduck's vloeistof (oplossing van asparagine + KH_2PO_4 + $MgSO_4$ + zuivere glycose), of een suspensie van gistcellen in water na eenige minuten koken, op dezelfde wijze als het bloeddecoct met PW etc. gezuiverd had, en van het ingedampte filtraat, voor en na koken met 1 % HCl, het reduceerend vermogen onderzocht, kon steeds de aanwezigheid van stoffen, die door de hydrolyse reduceerende eigenschappen krijgen, worden aangetoond.

Het is dus zeker, dat de stijging van het reduceerend vermogen van het vergiste bloeddecoct tengevolge van het ontstaan eener vergistbare monose, zooals ik dat in mijn proeven vond, voor een (onberekenbaar) gedeelte moet worden toegeschreven aan de van de gistcellen afkomstige polysacchariden (glycogeen, »Hefegummi«). Dat het bloed zelf een dextrine-achtige stof bevat, is wel boven twijfel verheven; ook ik kon dit bevestigen (zie p. 50). Tot de kennis van de eigenschappen of den aard dezer gom kunnen de proeven, die ik in dit hoofdstuk beschreef, slechts weinig bijdragen *); om het gedrag dezer gom van het bloed bij koken met zuren nauwkeuriger na te gaan, zou men het onvergiste bloed moeten onderzoeken.

Uit de uitkomsten der reductie-bepalingen voor en na hydrolyse van de koolhydraten van het vergiste bloed kan slechts dit worden besloten: **het bloed van het rund bevat geen saccharose, geen iso-maltose, en geen andere in 80 % alcohol oplosbare, gemakkelijk hydrolyseerbare koolhydraten.**

Het onvergistbare reduceerende koolhydraat van het bloed, dat in hoofdstuk II met de letter Y werd aangeduid, is ook in alcohol 80 % oplosbaar, en moet dus niet of moeilijk hydrolyseerbaar zijn. In overeenstemming hiermee is de uitkomst van de volgende proef:

Van onvergist, met PW gezuiverd decoct van paardenbloed werd de ééne helft (A) direct, de andere helft (B)

*) Alleen mag uit het feit, dat bij de hydrolyse slechts monosen ontstaan, worden besloten, dat de gom van het runderbloed een andere stof is dan de gom der menschenurine, waarvan het — blijkens de onderzoekingen van PEKELHARING en VAN HOOGENHUYZE en van NAGASAKI — vaststaat, dat zij bij koken met zoutzuur slechts een onvergistbare reduceerende suiker en geen monosen levert.

na 30 minuten koken met 1 % HCl, met azijnzure phenylhydrazine verhit. Het X=osazon van A en van B vertoonde microscopisch geheel hetzelfde beeld: naalden=bollen naast rosetten van fijne rechte naaldjes; en ook de smeltpunten waren dezelfde:

smeltpunt X=osazon van A: 189—191°;
» » » B: 190—191°.

Evenmin als de lactose was dus de suiker Y door het koken met zoutzuur ontleed.

VI.

Nog eenige reacties op suikers in het bloed.

Zoowel de phenylhydrazine-reacties als de hydrolyse-proeven leidden tot het besluit, dat iso-maltose in runder- en paardenbloed niet voorkomt. Daar echter over de aanwezigheid van iso-maltose in bloed de meeningen verdeeld zijn, kwam het mij niet overbodig voor, nog een derden weg in te slaan om, wat deze suiker betreft, nadere zekerheid te verkrijgen.

Iso-maltose is: glycose-β-glycoside (tegenover maltose = glycose-α-glycoside). Dit blijkt o.a. daaruit, dat iso-maltose door de gewone gist-enzymen (die uitsluitend a-glycosiden splitsen) niet wordt aangetast; maar wel door een enzym, dat tot het ontleden van β-glycosiden in staat is, nl. *emulsine*. Ik heb daarom nog de werking van emulsine op het bloeddecoct nagegaan.

Het enzym heb ik bereid uit amandelen, volgens de methode van Robiquet-Hérissey [1]); uit 235 gram amandelen verkreeg ik na zuivering ruim 3 gram van een emulsine-preparaat, dat op een 0,5 % amygdaline-oplossing, in een verdunning van 2 op 1000 daaraan toegevoegd, een sterke werking bleek te oefenen.

Nu werd 0,2 % emulsine toegevoegd aan bloeddecoct van rund of paard, dat te voren met lactosegist vergist

1) Beschreven door Bourquelot en Bridel: Annales de Chimie et de Phys. 8me série, tome XXIX, p. 148 (1913).

was*), door koken en filtreeren van de lactosegistcellen bevrijd en opnieuw gesteriliseerd. Vóór en terstond na de toevoeging der emulsine werd het reduceerend vermogen van het bloeddecoct bepaald: dit bleek tengevolge van de toevoeging van het enzym met een bedrag van 0,002—0,003 % te zijn toegenomen. Vervolgens werd de vloeistof 42 uur bij 30-35° bewaard: het reduceerend vermogen was daarna onveranderd. Daarna werd de rest der vloeistof in 2 deelen verdeeld: A voor gisting met T. monosa, B voor bereiding van osazon (dit laatste, nadat door middel van 5 volumina 92 % alcohol alle emulsine verwijderd was). Na de gisting was het reduceerend vermogen der vloeistof nog precies hetzelfde gebleven. Het osazon vertoonde slechts fijne, korte, in warm water oplosbare naaldjes, en geen spoor van glycosazon.

Conclusie: *het bloed bevat geen β-glycosiden, geen iso-maltose.*

Tenslotte heb ik, om den aard van de suiker Y na te gaan, nog eenige andere koolhydraatreacties op het met lactosegist vergiste bloeddecoct ingesteld.

Een positieve *orcine-reactie* verkreeg ik in het sterk ingedampte bloeddecoct steeds; ook nadat het door middel van P.W. en 80 %-alcohol zoo goed mogelijk gezuiverd was; in dit opzicht kon ik dus ANDERSSON's waarneming [1]) bevestigen. Was een cultuur van gistcellen (in veel grootere concentratie dan bij het vergisten van bloed gebruikt werd) in Hayduck's vloeistof op dezelfde wijze als het bloeddecoct behandeld, dan viel de orcine-reactie negatief uit.

*) Dit was noodig, omdat emulsine o.a. ook lactase bevat.

[1]) Bioch. Zeitschr. **12**, 6 (1908).

Daar de na koken met sterk zoutzuur en orcine ontstaande groene kleurstof (in amylalcohol oplosbaar: streep in het spectrum tusschen C en D) zoowel door pentosen als door glycuronzuur kan worden veroorzaakt, was het noodig, nader uit te maken, op welke van deze beide stoffen de positieve orcinereactie in het bloed berust.

Een *reactie op glycuronzuur*, die door pentosen en andere koolhydraten niet wordt gegeven, is die met HCl en naphthoresorcine, door TOLLENS [1]) aanbevolen in 1908. Door ROGER [2]) is zij voor het aantoonen van glycuronzuur in urine gewijzigd, omdat de naphthoresorcinereactie van TOLLENS (o.a. volgens de onderzoekingen van MANDEL en NEUBERG [3])) voor urine niet beslissend is, aangezien ook andere stoffen dan glycuronzuur, welker aanwezigheid in de urine niet is uit te sluiten, dezelfde of een zeer erop gelijkende reactie kunnen geven. De *reactie van Tollens-Roger* op glycuronzuur in urine wordt als volgt verricht: Bij 5 cc. urine 0,2 cc. 25 % ammonia en 2 cc. basisch loodacetaat; 't neerslag afcentrifugeeren, tweemaal met 1 % ammonia uitwasschen, en dan met behulp van 5 cc. water en 5 cc. sterk zoutzuur in een reageerbuis overbrengen; daarin, na toevoeging van 0,5 cc. 1% alcoholische naphthoresorcineoplossing, 15 minuten koken in 't waterbad; na afkoeling uitschudden met 10 cc. aether; de aetherische kleurstofoplossing is dan (vooral na filtreeren) bij aanwezigheid van glycuronzuur blauw, blauwviolet of roodviolet getint, en vertoont rechts van en op de D-lijn een absorptieband. — Ik heb de reactie van ROGER op normale urine toegepast, en kreeg een positief resultaat, zooals te verwachten was. Ook in het met lactosegist

[1]) Ber. d. deutsehen chem. Ges. **41**, 1788 (1908).
[2]) Comptes rendus de la Soc. de Biol. **78**, 714 (1915).
[3]) Bioch. Zeitschr. **13**, 148 (1908).

vergiste bloeddecoct van rund en paard vond ik de reactie van ROGER positief; na zuivering met PW viel de reactie in de meeste gevallen positief, in sommige echter negatief uit. Hieruit moet worden besloten, dat glycuronzuur in het met PW gezuiverde bloeddecoct kan voorkomen, en dat voor het aantoonen van de aanwezigheid van pentosen daarin de orcine-reactie onvoldoende is.

Een reactie, die in staat stelt om *glycuronzuur en pentosen van elkaar te onderscheiden* is de *reactie van Neumann*. Het was NEUMANN [1]) gebleken, dat de kleurreactie met orcine scherper wordt, als men als oplosmiddel voor de kleurstof ijsazijn gebruikt (in plaats van den aethylalcohol van TOLLENS of den amylalcohol van SALKOWSKI); en dat bovendien de reactie veel gevoeliger wordt, als er zoo weinig mogelijk water bij aanwezig is (als zuur moet dan geconcentreerd H_2SO_4 worden gebruikt, in plaats van het in ijsazijn niet voldoende oplosbare HCl); de resultaten zijn volgens NEUMANN de beste, als naast zeer weinig water veel ijsazijn aanwezig is, en als niet te veel H_2SO_4 bij niet te hooge temperatuur werkt (anders ontstaan mengkleuren door de werking van het H_2SO_4 op de orcine).

Uitvoering der reactie van Neumann: In een reageerbuis worden 10 droppels (0,5 cc.) der te onderzoeken suikeroplossing met 5 cc. 99 % ijsazijn en eenige droppels eener 5 % alcoholische orcine-oplossing na omschudden tot koken verhit; daarna voegt men uit een droppelfleschje geconc. H_2SO_4 toe, waarbij men na iedere 5 droppels flink schudt; hiermee gaat men voort, totdat na het omschudden een duidelijke kleur blijft bestaan. Dit eindpunt is afhankelijk van de concentratie der

[1]) Berliner klinische Wochenschr. (**1904**), p. 1073.

suikeroplossing; het is echter ook bij zwakke suiker-oplossingen (0,1-0,2 %) door 40-50 droppels H_2SO_4 te bereiken. Meer dan 50 droppels H_2SO_4 mogen niet worden toegevoegd. Ook moet men, zoodra een duidelijke tint is verschenen, met het toevoegen van H_2SO_4 ophouden, daar anders mengkleuren ontstaan of de kleur te donker wordt. Men onderzoekt na eenige minuten de kleurstofoplossing spectroscopisch. Is de oplossing te sterk gekleurd, dan kan men steeds met ijsazijn verdunnen, zonder dat de tint verandert. Toevoeging van water of alcohol brengt bij sommige suikers verandering der tint teweeg. Men verkrijgt zoo voor verschillende suikers typische kleurreacties:

Koolhydraat.	Kleur.	Absorptie-strepen.	Kleursverandering door water of alcohol.
Arabinose.	Roodviolet.	Rechts van D: bedekt geel en geelgroen.	Geen.
Xylose.	Blauwviolet; (koud:) blauw.	*1*: Rechts van C, in 't oranje; *2*: als bij arabinose, doch zwakker. Bij het staan neemt *1* in intensiteit toe, *2* af.	Geen.
Glycuronzuur.	Groen.	Links van C in het rood; verder is het geheele spectrum beschaduwd.	Wordt roodachtig.
Glycose.	Bruinrood.	In het groen, zoodat vóór de streep nog groen, er achter blauw en violet te zien is.	Geen.
Fructose.	Bruin; (koud:) geelbruin.	*1*: Links van C in het rood (als bij glycuronzuur); *2*: verduistering, beginnend als bij glycose, maar tot aan het einde van het spectrum.	Wordt geelgroen.

Normale urine geeft volgens NEUMANN een bruingele kleur, die waarschijnlijk als mengkleur van de sporen van glycose en glycuronzuur afkomstig is.

FRITZ SACHS [1]) geeft, waar hij de verschillende kleurreacties op pentosen bespreekt (die van JOLLES, TOLLENS-SALKOWSKI, NEUMANN en BIAL), aan de reactie van NEUMANN de voorkeur. Wel vindt hij de reactie voor glycuronzuur niet zoo gevoelig als voor pentosen, en blijkt in zijn proeven ook het onderscheid tusschen arabinose en xylose bij de reactie niet groot; maar als middel om pentosen van hexosen en glycuronzuur te onderscheiden vindt hij de reactie betrouwbaar.

Ook ik kon, bij het uitvoeren van de reactie op een arabinose-oplossing, op normale urine en op arabinose bevattende urine, NEUMANN's uitkomsten in hoofdzaak bevestigen. Ik bemerkte daarbij, dat de reactie mislukt, indien men H_2SO_4 gebruikt dat niet zeer geconcentreerd is.

Onderzochte oplossing.	Kleur.	Spectrum.	Kleursverandering door water of alcohol.
0,5 % arabinose.	Roodviolet.	Band in geel en geelgroen.	Geen.
0,2 % arabinose.	Roodviolet.	Band in geel en geelgroen.	Geen.
Normale urine (geconc.)	Groenbruin.	Zwakke streep midden in het rood; beschaduwing v. h. geheele spectrum.	Geen.
Deze urine met 0,2 % arabinose.	Roodviolet.	Band in geel en geelgroen; zwakke streep in het rood.	Geen.

Daarna heb ik de reactie van NEUMANN op dezelfde wijze met ingedampt bloeddecoct van runderen en paarden verricht, nadat dit door middel van PW of van 80 % alcohol gezuiverd was. Steeds ontstond een roodviolette

[1]) Bioch. Zeitschr. 1, 383 (1906).

of blauwviolette kleur, en vertoonde het spectrum een duidelijken absorptieband in het geel en geelgroen. Toevoeging van water aan de azijnzure oplossing der kleurstof had in deze proeven nooit een verandering der kleur tengevolge; de glycuronzuurverbindingen (die in sommige gevallen de reactie van ROGER positief doen zijn) zijn blijkbaar in onvoldoende concentratie aanwezig om bij de reactie van NEUMANN tot uiting te komen.

Ter controle van den invloed der gistcellen heb ik de reactie van NEUMANN ook weer verricht op een 2 dagen oude cultuur van de gistcellen in Hayduck's vloeistof, die na de gisting op dezelfde wijze als het bloeddecoct van eiwit bevrijd en gezuiverd was en tot enkele cc. ingedampt. Na toevoeging van 50 droppels H_2SO_4 was bij de reactie van NEUMANN nog geen spoor van violette tint waar te nemen; na de afkoeling bleef een lichtgeelgroene tint bestaan; spectroscopisch: geen verduistering.

Hieruit mag worden besloten, dat in het bloed van rund en paard een suiker met pentose-eigenschappen voorkomt.

Welke pentose dit is, — daarover geeft de reactie van NEUMANN niet de geringste aanwijzing; en de conclusie van SACHS, dat ook bij het gebruiken van zuivere oplossingen van verschillende pentosen slechts onbeduidende verschillen in den uitslag der kleurreactie zichtbaar worden, moedigt niet aan, in dit opzicht nog meer van deze kleurreactie te verwachten.

Overzicht der eigenschappen van de stof Y.

a. Met benzoylchloride en NaOH vormt de stof, evenals koolhydraten, een in water onoplosbare verbinding.

b. In 80 % alcohol is de stof oplosbaar. *Y is dus geen glycogeen, dextrine, gom of ander polysaccharide.*

c. Het phenylosazon van Y is in warm water oplosbaar. Kristalvorm van het osazon: soms fijne, korte naaldjes, solitair of in stervormige groepen, — soms lange, fijne, gebogen naalden in rosetten; deze laatste kristalvorm gaat na eenmaal omkristalliseeren meestal, na tweemaal omkristalliseeren steeds verloren (dan weer korte naaldjes). Smeltpunt van het osazon: 181–182°; stikstofgehalte: 10,28 %. — *Y is dus zeker geen glycuronzuur, en ook geen enkelvoudige pentose; 't is een suiker met ± 12 koolstofatomen. Wat oplosbaarheid, kristalvorm, smeltpunt en stikstofgehalte van het osazon betreft, komt Y alleen met melibiose en met de suiker van Cammidge overeen.*

d. Ontleding door enzymen. Noch door de enzymen van saccharomyces cerevisiae, noch door die van lactosegist, noch door die van emulsine wordt Y aangetast. — *Y is derhalve geen hexose, maltose, lactose, melibiose; ook geen iso-maltose of ander β-glycoside.*

e. Reduceerende eigenschappen. Het volkomen van glycose, lactose en eiwitstoffen bevrijde bloeddecoct heeft nog een reduceerend vermogen van meer dan 0,006–0,012 %, dat niet geheel door de sporen van bekende reduceerende stoffen, niet-koolhydraten (kreatinine, etc.), kan worden verklaard. De waarschijnlijkheid, dat een deel van deze restreductie op rekening van Y moet worden gesteld, wordt tot zekerheid, als we bedenken, dat het vermogen van Y, met phenylhydrazine een osazon te vormen, een bewijs is voor de aanwezigheid eener vrije carbonylgroep in het molecule. — *Y bezit reduceerend vermogen.*

f. Optische activiteit. Het mengsel van suikers, uit het bloeddecoct door middel van benzoylchloride in zuivere oplossing verkregen, vertoont (als glycose berekend)

relatief sterker reduceerend dan rechtsdraaiend vermogen. Lactose (ook in dit mengsel voorhanden) heeft geringer reduceerend vermogen dan glycose (bij gelijke rechtsdraaing). Daar een suiker met 12 C-atomen zwakker reduceerend vermogen heeft dan glycose, kan dus worden besloten: *Y heeft een aanmerkelijk geringer rechtsdraaiend vermogen dan glycose.*

g. Hydrolyse door koken met verdunde zuren. Nadat door 80 % alcohol de polysacchariden uit het bloed zijn verwijderd, neemt door koken met 1 % HCl het reduceerend vermogen van het bloeddecoct niet of nauwelijks meer toe. Dit is niet het gevolg van vernieling van Y, maar van onveranderd blijven; want indien Y door koken met HCl vernield werd, zou daarna het reduceerend vermogen van het bloeddecoct gedaald moeten zijn; ook verandert het smeltpunt van X-osazon niet, wanneer te voren het bloeddecoct met HCl gekookt is. — *Y wordt dus niet of zeer langzaam gehydrolyseerd door koken met 1 % zoutzuur.*

h. De reactie van NEUMANN op pentosen is in het bloeddecoct positief. — *Y is dus een aan de pentosen verwante suiker.*

De positieve pentose-reactie is het eenige gegeven, dat zich moeilijk met het koolstofgehalte van Y laat vereenigen. Het is evenwel zeer onwaarschijnlijk, dat de pentose-reactie op een andere suiker dan Y berust; want dan zou Y-osazon een mengsel moeten zijn van twee verschillende osazonen (pentosazonen zijn ook in warm water oplosbaar), en zou het niet zulk een scherp en in verschillende proeven even hoog smeltpunt kunnen hebben. Het overzicht der eigenschappen voert dus tot de **veronderstelling: dat Y is een aan de di-sacchariden verwante stof, — evenwel geen bihexose, doch een suiker met twee**

(of althans minstens één) pentose-groepen (methyl-pentose-groepen?) in haar molecule.

In eigenschappen en C-gehalte vertoont Y een merkwaardige overeenkomst met de suiker van CAMMIDGE. *) De vorm, waarin de beide suikers in het dierlijke organisme voorkomen, is echter geheel verschillend: de suiker van CAMMIDGE komt niet gepraeformeerd in de urine (van den mensch) voor, doch ontstaat eerst bij hydrolyse van de gom uit urine; Y komt als zoodanig voor in het bloed (van rund en paard), en ontstaat niet bij de hydrolytische splitsing van de gom uit bloed. Men is nog allerminst gerechtigd, hieruit iets omtrent het al of niet identiek zijn der beide suikers af te leiden. Zoo ver is het onderzoek nog lang niet.

Daarvoor zal eerst:

1°. de gom uit het runder- en paardenbloed zuiverder moeten worden bereid en nauwkeuriger onderzocht dan dit in mijn onderzoek geschiedde;

2°. ook dierenurine en — zoo mogelijk — menschenbloed in het onderzoek moeten worden betrokken;

3°. zoowel de suiker van CAMMIDGE als de suiker Y uit het bloed chemisch zuiver moeten worden bereid, teneinde in eigenschappen en samenstelling nauwkeurig te kunnen worden vergeleken.

---

*) Over de vraag, of de suiker van CAMMIDGE de kleurreacties der pentosen geeft, zijn de meeningen in de literatuur verdeeld. CAMMIDGE zelf [Proceed. royal Soc. London **81**, 375 (1909)] vond de phloroglucine-reactie positief, en de orcine-reactie positief wat het spectrum betreft, — en dat, terwijl door de voorbehandeling der suikeroplossing met basisch lood-acetaat bijmenging van glycuronzuur kon worden uitgesloten. PEKELHARING en VAN HOOGENHUYZE [Zeitschr. f. physiol. Chemie **91**, 151 (1914)] daarentegen konden noch met de direct uit urine bereide, noch met de uit de gom bereide suiker een positieve orcine- of phloroglucine-reactie verkrijgen.

VII.

Over den aard der suikers van het bloed van den mensch.

Daar het onderzoek der suikers van het bloed van den mensch (door venaepunctie verkregen uit de v. mediana cubiti), voor zoover mogelijk, op dezelfde wijze werd verricht, als hierboven voor runder- en paardenbloed is beschreven, zal ik volstaan met alleen de uitkomsten van het onderzoek te vermelden. Voor sommige bijzonderheden, vooral aangaande de bepalingen van het reduceerend vermogen, vergelijke men hoofdstuk X.

Uit het bloed van gezonde menschen, die in het laatste halve etmaal geen voedsel hadden gebruikt, heb ik na vergisting met T. monosa steeds een in warm water oplosbaar osazon kunnen verkrijgen, bestaande uit bollen en rosetten van fijne, rechte kristalnaalden van verschillende lengte. Na vergisting met lactosegist vond ik een osazon, bestaande uit zeer korte, fijne naaldjes. Nooit vond ik rosetten van gebogen naalden. Uit den aard der zaak was de hoeveelheid osazon veel te klein voor een smeltpuntbepaling.

Na vergisting van het decoct van menschenbloed met T. monosa blijft een restreductie over, groot 0,019-0,031 %. Ongeveer de helft der restreductie berust op stoffen, die door PW kunnen worden neergeslagen.

Vergelijking van de restreductie na vergisting met T. monosa, S. cerevisiae en lactosegist geeft geen aan-

wijzing omtrent de aanwezigheid van lactose in het bloed van den normalen mensch. (Dit was, in aanmerking genomen de te geringe concentratie van het bloeddecoct, ook niet te verwachten).

Het door indampen sterk geconcentreerde bloeddecoct geeft steeds een positieve reactie van ROGER en van NEUMANN. —

Zeker is dus alleen, dat in menschenbloed glycose, glycuronzuur, en een aan de pentosen verwante suiker voorkomt. De aanwezigheid van lactose wordt door den kristalvorm van het osazon waarschijnlijk gemaakt (vgl. ook p. 141), door de bepalingen van het reduceerend vermogen na gisting noch bevestigd, noch uitgesloten, — blijft dus eenigzins onzeker. Om dezelfde reden is uit het onderzoek van het reduceerend vermogen ook niets te besluiten aangaande het voorkomen van maltose, melibiose, enz.

VIII.

Bepaling van de hoeveelheid suikers in runder- en paardenbloed.

De methoden, toegepast bij het onderzoek naar het al of niet voorkomen van sommige vergistbare, reduceerende suikers in het bloed, en de uitkomsten, bij dat onderzoek verkregen, maken het nu mogelijk: nauwkeurig de hoeveelheid glycose en lactose van het bloed te bepalen, — mits een voldoende hoeveelheid bloed beschikbaar is. Van de na vergisting met lactosegist en na zuivering met P W overblijvende restreductie berust dan een voorloopig onberekenbaar gedeelte op de suiker Y. Een maat voor de hoeveelheid gom in het bloed zou men kunnen verkrijgen, door het reduceerend vermogen van het onvergiste, met P W gezuiverde bloeddecoct vóór en na langdurige hydrolyse met HCl te bepalen; in hoofdstuk V (p. 92) toch is gebleken, dat de hoeveelheid gepaard glycuronzuur, die het bloeddecoct na zuivering met P W nog bevat, zoo gering is, dat zij bij de reductie-bepaling na hydrolyse niet tot uiting komt. Ik heb geen bepalingen van de hoeveelheid gom verricht, maar ik heb mij bij mijn quantitatief onderzoek beperkt tot de bepaling van de direct-reduceerende stoffen van het bloed.

Alleen glycose, lactose en restreductie heb ik dus bepaald. Hiervoor was noodig: 1°: het bloed zoo spoedig mogelijk aan den invloed van glycolyse te onttrekken of

de glycolyse in rekening te brengen; 2°: bij de bereiding van het decoct geen in water oplosbare stoffen verloren te laten gaan.

Om de glycolyse tot een minimum te beperken, heb ik 1000 cc. gedefibrineerd bloed binnen 5 minuten na het slachten van het dier in het laboratorium der gemeente-slachtplaats in 4 Liter kokend water (met 45 cc. normaal HCl) geschonken, en bij neutrale reactie gekookt, gefiltreerd, enz. Ten einde een indruk van de grootte der glycolyse in het gedefibrineerde bloed (bij ± 15°) te verkrijgen, werd een ander gedeelte van hetzelfde bloed naar het physiologisch laboratorium overgebracht en aldaar na een bepaalden tijd op dezelfde wijze behandeld. Bij het overschenken en filtreeren van het bloed en van het decoct werden maatglazen, zuigfilter, uitdampschalen enz. steeds tweemaal zorgvuldig met water nagespoeld; het coagulum werd door middel van een handpers sterk uitgeperst door een doek, met een geruime hoeveelheid water aangemengd en weer gecoleerd, nog eens met water gemengd en nog eens gecoleerd. Waschwater en perssap werden, na filtratie en uitwasschen van het filter, bij de hoofdmassa van het decoct gevoegd; en deze vloeistof werd nu bij zwak zure reactie ingedampt tot het vereischte volumen, dat weer nauwkeurig werd afgemeten en zoo groot gekozen, dat het reduceerend vermogen 0,100—0,200 % bedroeg. Na de bepaling van het reduceerend vermogen werd de rest van het decoct tot $^1/_3$ à $^1/_4$ deel van haar volumen ingedampt en in verschillende porties verdeeld; deze porties werden gesteriliseerd, 42 uur vergist, weer tot haar oorspronkelijk volumen (dat zij vóór het steriliseeren hadden) aangevuld en gefiltreerd; in de filtraten werd ten slotte de restreductie bepaald.

Wegens de practische bezwaren (het bewerken van het bloed in de gemeenteslachtplaats en het overbrengen van de groote hoeveelheid decoct naar het physiologisch laboratorium) aan het onderzoek verbonden, heb ik slechts van één stier en één koe het suikergehalte van het bloed bepaald. Het decoct van het stierenbloed, dat ik 5 minuten na het slachten in de gemeenteslachtplaats bereidde, is verongelukt. Van de wijze, waarop de uitkomsten van het in het laboratorium bewerkte stierenbloed berekend werden, zal ik hier een eenigszins uitvoerige beschrijving geven.

2000 cc. stierenbloed werd 45 minuten na het slachten in bewerking genomen. Het op de bovenbeschreven wijze bereide decoct had na bijvoeging van het waschwater van uitdampschaal en filter een volumen van 800 c c. Voor de reductie van 10 cc. koperoplossing (zie p. 73—74 bleek hiervan noodig in 3 bepalingen resp. 10,7—10,65—10,8 cc, of gemiddeld 10,7cc.; 10,7 c.c. decoct reduceert dus even sterk als 0,020 gramglycose, en heeft derhalve een reduceerend vermogen, groot $\frac{100}{10,7} \times 0,020 = 0,187\ ^0/_0$. De rest van het decoct (750 cc.) werd tot ± 200 cc. ingedampt, gefiltreerd, en met het waschwater van schaal en filter tot precies 250 cc. aangevuld.*) Drie porties van 80 cc, gemerkt T, C en L, werden nu (na sterilisatie) met een platina-oogje vol gistcellen geënt: T met T. monosa, C met S. cerevisiae, L met lactosegist, — en 42 uur vergist. Daarna werden de porties weer nauwkeurig tot 80 cc. aangevuld en gefiltreerd. Voor de reductie van 10 cc. koperoplossing was nu noodig:

*) Als ik een dergelijk sterk-ingedampt decoct weer tot het vorige volumen (hier dus 750 cc.) verdunde, bleek het reduceerend vermogen onveranderd te zijn gebleven. Dit controleerde ik nu en dan, om na te gaan of bij het sterke indampen geen reduceerende stoffen werden vernield, of bij het filtreeren met de zouten verwijderd.

van T: 14,8—14,7 : gemiddeld 14,75 cc;
van C: 14,9—14,75—14,85: » 14,85 cc;
van L: 15,5—15,7—15,65: » 15,6 cc.

Het reduceerend vermogen van het decoct is dus:

na vergisting met T. monosa: $\frac{2}{14,75} = 0,136\,\%$;

» » » S. cerevisiae: $\frac{2}{14,85} = 0,135\,\%$;

» » » lactosegist: $\frac{2}{15,6} = 0,128\,\%$.

Brengen we nu tenslotte de volumina van bloed en ingedampt decoct in rekening, dan vinden we voor het bloed:

Totale reductie: $\frac{800}{2000} \times 0,187 = 0,075\,\%$.

Reductie na vergisting:

met
- T. monosa: $\frac{250}{750} \times \frac{800}{2000} \times 0,136 = 0,018\,\%$
- S. cerevisiae: $\frac{250}{750} \times \frac{800}{2000} \times 0,135 = 0,018\,\%$
- lactosegist: $\frac{250}{750} \times \frac{800}{2000} \times 0,120 = 0,017\,\%$

Het stierenbloed bevatte dus na 45 minuten glycolyse: 0,057 % glycose, en een hoeveelheid lactose, in reduceerend vermogen overeenkomend met 0,001 % glycose.

Met bloed eener koe verkreeg ik de volgende uitkomsten:

KOEIENBLOED.	Totale reductie.	Reductie na gisting met:		Reductie glycose.	Reductie lactose.
		T. monosa.	lactosegist.		
5 minuten na het slachten	0,076 %	0,019 %	0,016 %	0,057 %	0,003 %
45 minuten na het slachten	0,072	0,020	0,017	0,052	0,003
Glycolyse in 40 minuten bij ± 15°				0,005	0,000

In 40 minuten was door glycolyse dus 0,005 % glycose verdwenen; lactolyse was niet waarneembaar. Daar het stierenbloed op volkomen dezelfde wijze (en bij ± dezelfde temperatuur) als dit koeienbloed onderzocht was, mogen we aannemen, dat het glycose-gehalte van het stierenbloed vóór de glycolyse ongeveer 0,057 + 0,005 = ± 0,062 % bedroeg.

Uit deze twee proeven vinden we dus voor het **glycose-gehalte van runderbloed: ± 0,060 %**; en — in aanmerking nemende, dat het reduceerend vermogen van lactose ongeveer $^3/_5$ van dat van glycose bedraagt —: voor het **lactose-gehalte van stierenbloed 0,002 %**, en **van koeienbloed 0,005 %** (bedragen, die met de in hoofdstuk IV, bij een aantal minimum-bepalingen, gevondene overeenstemmen).

Voor de quantitatieve bepaling van de suikers van het bloed van het paard heb ik nooit over geheel versch paardenbloed kunnen beschikken; het glycose-gehalte is dus steeds enkele duizendste procenten hooger dan de in de tabel aangegeven waarden:

PAARDENBLOED.		Totale reductie.	Reductie na gisting met: T.monosa.	S.cerevisiae.	lactose-gist.	Reductie glycose.	Reductie lactose.
Paard I.	Na 1 uur. .	0,087 %	0,025 %	0,025 %	0,023 %	0,062 %	0,002 %
Paard II	Na $2^1/_2$ uur	0,078	0,024	0,024	0,022	0,054	0,002
	Na 4 uur.	0,070	0,022	0,022	0,020	0,048	0,002
	Glycolyse in $1^1/_2$ uur bij ± 15°.					0,006	0,000

Nemen we de glycolyse, die ook hier 0,004—0,005 % per uur bedraagt, in aanmerking, dan vinden we voor het **glycose-gehalte van paardenbloed: ± 0,065 %**, dus ongeveer hetzelfde als dat van runderbloed. Het **lactose-gehalte: 0,003—0,004 %**, houdt het midden tusschen dat van stieren- en koeienbloed (ik weet niet, of de onderzochte paarden van het mannelijk of vrouwelijk geslacht waren). Een vermindering van het lactose-gehalte tijdens het bewaren bij kamertemperatuur is, ook na 4 uur, niet te constateeren.

Bij deze bloedsuikerbepalingen moet worden opgemerkt, dat zij met het bloed van slachtdieren werden verricht, dus van dieren, die in de laatste uren geen voedsel hadden gebruikt; voorts: dat het gevonden suikergehalte betrekking heeft op het gedefibrineerde bloed.

Om het suikergehalte van het totaal-bloed te bepalen, gebruikte ik bloed uit de v. jugularis, dat door toevoeging van 0,1 % kaliumoxalaat vloeibaar was gebleven, en overigens op de gewone wijze behandeld. Allereerst diende nu echter te worden nagegaan, of de verwijdering van het calcium uit het bloeddecoct, door de toevoeging van een geringe overmaat van kaliumoxalaat, soms remmenden invloed op de gistwerking had. Om dat uit te maken voegde ik bij decoct van stierenbloed (door lactosegist van al zijn vergistbare suikers bevrijd) een geringe overmaat van kaliumoxalaat; na affiltreeren van het calciumoxalaat was de reductie van het filtraat: 0,037 % (bepaald volgens de in hoofdstuk IX te beschrijven methode). In 3 porties (A, B en C) van dit bloeddecoct werden resp. opgelost: 0,5 % glycose, 0,5 % maltose en 0,5 % lactose; daarna werd A 42 uur met T. monosa vergist, B met S. cerevisiae, C met lactosegist. Na de gisting bedroeg de reductie: A: 0,036 %; B:

0,037 %; C: 0,036 %. Dus: toevoeging van een geringe overmaat van kaliumoxalaat hindert de gisting niet.

Met het in kaliumoxalaat opgevangen paardenbloed, dat ± ½ uur na de venaepunctie in bewerking genomen werd, verkreeg ik de volgende uitkomsten:

PAARDENBLOED. (totaal-bloed).	Totale reductie.	Reductie na gisting met: T.monosa.	S.cerevisiae.	lactose-gist.	Reductie glycose.	Reductie lactose.
½ uur na venaepunctie	0,090 %	0,023 %	0,023 %	0,020 %	0,067 %	0,003 %

Dus: ongeveer dezelfde uitkomsten als die, welke voor het gedefibrineerde bloed werden gevonden.

Dat in het gedefibrineerde bloed de glycolyse sterker is dan in het oxalaat-bloed, is wel te verwachten; want het glycolytisch enzym komt in het intacte bloed uitsluitend in de gevormde elementen voor, en allerlei middelen, die de stolling van het bloed beletten, blijken ook de glycolyse geheel of gedeeltelijk te kunnen tegengaan. — Kleine veranderingen in het bloedsuikergehalte, die tengevolge van het defibrineeren zouden kunnen ontstaan, zou men moeten opsporen door 2 porties van hetzelfde bloed, wel en niet gedefibrineerd, in reduceerend vermogen te vergelijken. Ik heb dat niet onderzocht.

IX.

Wijziging der reductie-methode van Benedict, zoo dat ook geringe hoeveelheden reduceerende stof ermee kunnen worden bepaald.

Met de methode van BENEDICT-NAGASAKI, zooals ik haar aan 't eind van hoofdstuk III beschreef, kan men wel nauwkeurig het reduceerend vermogen eener oplossing bepalen, doch slechts dan, wanneer dit reduceerend vermogen 0,200—0,100 % bedraagt; men heeft dan voor één bepaling minstens 10—20 cc. dier oplossing noodig. Om een reductie, kleiner dan 0,100 % te bepalen, moet de vloeistof eerst worden ingedampt; hiervoor is dus meer vloeistof noodig.*)

Om volgens de methode van BENEDICT-NAGASAKI het suikergehalte van menschenbloed te bepalen, zou men dus ook over veel bloed moeten beschikken. Voor een berekening van de minimum hoeveelheid bloed, die

*) Dit is geen groot bezwaar, als het bloedsuikerbepalingen van groote slachtdieren als runderen en paarden geldt: men kan dan over liters bloed beschikken, en het decoct laat zich (als het met zorg van de meeste eiwitstoffen bevrijd is) zonder bezwaar tot op $^1/_{10}$—$^1/_{20}$ van het volumen van het bloed, waarvan het afkomstig is, indampen (vgl. p. 116, noot). Men bereikt met dat indampen dan tegelijk het voordeel, dat de uitkomsten der suikerbepaling van het bloed des te nauwkeuriger worden, zoodat aan kleinere verschillen grootere waarde kan worden gehecht; vandaar, dat in runder- en paardenbloed na het sterke indampen lactose kon worden aangetoond en bepaald, terwijl toch de reductie, die deze lactose in het oningedampte bloed vertoont (0,001—0,003 %) zich nauwelijks buiten de grenzen der bepalingsfouten uitstrekt.

noodig is, heeft men slechts te bedenken, dat volgens deze methode bepaald wordt de hoeveelheid reduceerende stof, die met 20 mg glycose overeenstemt, en dat het reduceerend vermogen van het zoogdierenbloed vóór de gisting ± 0,08 %, na de gisting ± 0,02 % bedraagt. Voor een bepaling van het glycose-gehalte heeft men dus (voor benaderende en definitieve bepalingen samen) minstens $2 \times 25 + 2 \times 100 = 250$ cc. bloed noodig; en indien men de restreductie ook wil bepalen na gisting met andere gistsoorten dan T. monosa, dan is voor iedere gistsoort nog 200 cc bloed meer noodig. Ter bepaling van het suikergehalte van menschenbloed, dat men — zonder te groote bezwaren voor den proefpersoon — slechts in hoeveelheden van hoogstens 30—100 cc. tegelijk kan verkrijgen, is de reductie-methode volgens BENEDICT-NAGASAKI dus onbruikbaar.

Om van menschenbloed, liefst in hoeveelheden van niet meer dan 10—20 cc, het gehalte aan reduceerende stoffen voor en na gisting tóch met het reagens van BENEDICT te kunnen bepalen, heb ik getracht een zoodanige verandering in de werkwijze aan te brengen, dat slechts enkele cc. bloed voor elke titratie noodig zijn, terwijl toch de nauwkeurigheid der methode (tot op 0,001 à 0,002 %) bewaard blijft.

Deze eisch van nauwkeurigheid brengt al mede, dat de verandering niet gezocht kan worden in het werken met minder dan 10 cc. koperoplossing. Ik heb herhaaldelijk gepoogd, 5 cc. koperoplossing voor de titratie te bezigen; maar steeds ben ik daar weer van teruggekomen, want *1°*: wordt de nauwkeurigheid der bepalingen daardoor tot op ½ verkleind, en *2°*: zijn de bepalingen dan ook in absolute waarde niet meer betrouwbaar (en dus met die, welke met 10 cc. koperoplossing verricht worden,

niet meer te vergelijken), blijkbaar omdat bij het koken van het reductie-mengsel in de helft der door NAGASAKI voorgeschreven hoeveelheid de invloed der verdamping zich sterker doet gelden op de concentratie (en dus op kookpunt en alkaliciteit). Voorwaarde voor betrouwbare uitkomsten der methode is vóór alles: dat 10 cc. koper-oplossing wordt gebruikt, en dat daaraan tijdens de titratie nooit minder dan 10 en nooit meer dan 20 cc. vloeistof wordt toegevoegd.

Een voor de hand liggend hulpmiddel, om van een zwak reduceerende oplossing het reduceerend vermogen te bepalen, is: de titratie te verrichten, nadat aan die oplossing een bekende hoeveelheid glycose is toegevoegd. Dit middel is dan ook meermalen voor andere reductie-methoden met min of meer succes toegepast. Om de moeite van het wegen voor elke bepaling te ontgaan, zou hier aanbevelenswaardig zijn: een glycose-oplossing van b.v. precies 0,200 % te maken, en daarvan zooveel aan het te onderzoeken bloeddecoct toe te voegen, dat het reduceerend vermogen van het mengsel ± 0,150 % wordt; en daarna dit mengsel volgens NAGASAKI te bepalen. Indien bloeddecoct en suikeroplossing maar nauwkeurig worden afgemeten (uit buretten of pipetten, niet uit maatglazen), kan de nauwkeurigheid der methode door de toevoeging van suiker niet verminderen. — Ik heb echter de toe-voeging van glycose nog eenigszins anders ingericht, en wel ter vereenvoudiging. Is het n.l. bij het titreeren volgens BENEDICT-NAGASAKI al een zeker practisch be-zwaar, telkens voor iedere volgende reductie-bepaling de buret te moeten schoonspoelen, drogen en weer met de nieuwe te onderzoeken vloeistof vullen, — indien deze vloeistof eerst nog moest worden vermengd met een glycose-oplossing, zouden nog 2 buretten (of pipetten)

voor elke titratie noodig zijn. Hoe men dit bezwaar van omslachtigheid kan ontgaan, moge blijken uit de hier volgende

Beschrijving der gewijzigde methode.

10 cc. der koperoplossing van BENEDICT (echter met 250 gram KCNS per liter, in plaats van 100 gram: zie p. 74) wordt in een kolfje van 150 cc, na toevoeging van 5 gram Na_2CO_3 (gekrist.) en een weinig talk, tot koken verhit. Dan wordt *uit een pipet precies 10 cc. van het bloeddecoct* (reduceerend vermogen $< 0{,}100\ ^0/_0$) toegevoegd, en vervolgens *uit een buret* zooveel van een nauwkeurig bekende ($\pm 0{,}2\ ^0/_0$) *glycose-oplossing*, totdat een groot neerslag van cupro-rhodanaat is ontstaan en de blauwe kleur merkbaar in intensiteit begint af te nemen (droppelsgewijs toevoegen, terwijl het reductie-mengsel gestadig kookt); na 3 minuten doorkoken: iedere minuut nog 1 of 0,5 cc. glycose-oplossing toevoegen, totdat de blauwe kleur geheel verdwenen is. — Bij de definitieve bepaling wordt, nadat weer 10 cc. bloeddecoct uit de pipet bij de koperoplossing in de kookkolf is gebracht, droppelsgewijs ongeveer 1 cc. minder glycose-oplossing toegevoegd, dan bij de benaderende bepaling noodig bleek; en na 4 minuten doorkoken: elke 30 secunden 4—1 droppels, tot verdwijnen van de blauwe kleur.*)

De kleuromslag is scherp waar te nemen: toevoeging van één droppel der glycose-oplossing doet bij het eindpunt der titratie de lichtgroenblauwe tint (het best waar te nemen boven een goed verlichten witten onder-grond) in een lichtgele tint omslaan. Eén droppel $0{,}200\ ^0/_0$

*) Heeft de glycose-oplossing een reduceerend vermogen, groot $p\ ^0/_0$, en is daarvan voor de titratie n cc. noodig geweest, dan is het gezochte reduceerend vermogen: $x = 0{,}200 - 0{,}1 \times p \times n\ ^0/_0$.

glycose-oplossing bevat 0,1 mg glycose; dit geeft dus op de 10 cc. bloeddecoct een nauwkeurigheid van 0,001 %.

De 10 cc. koperoplossing wordt gereduceerd door 20 mg glycose. Is de glycose-oplossing precies 0,200 % sterk, dan heeft men dus bij 10 cc. bloeddecoct van 0,100 %: 5,0 cc. glycose-oplossing uit de buret toe te voegen, en bij 10 cc. bloeddecoct van 0,005 %: 9,75 cc. In het geheel wordt dan 15 tot 19,75 cc. vloeistof bij de koperoplossing gevoegd, zoodat bij deze wijze van titreeren de verdunningen der 10 cc. koperoplossing wisselen binnen nog nauwere grenzen, dan volgens NAGASAKI moeten worden in acht genomen. De uitkomsten der methode moeten dus ook in absolute waarde betrouwbaar zijn, mits men nog één voorzorg neemt: bij het bepalen van de sterkte der glycose-oplossing (van ± 0,2 %) ook binnen dezelfde grenzen van verdunning te blijven, en wel door daarbij de 10 cc. koperoplossing eerst met ± 8 cc. water te verdunnen.

Het gebruik der glycose-oplossing brengt nog een klein bezwaar mee: zij gaat (vooral in het licht en op warme dagen) in reduceerend vermogen achteruit (en moet dus steeds in donker bewaard worden). In den zomer bedraagt de daling der reductie soms wel 0,001 % per etmaal; dan is dus dagelijksche controle noodig. In den winter behoeft deze controle slechts 2 à 3 maal per week te geschieden. Ik heb steeds, wanneer ik reductie-bepalingen verrichtte, zoowel vóór als na de reeks bepalingen het reduceerend vermogen der glycose-oplossing gecontroleerd: een betrekkelijk kleine moeite, wanneer men verscheidene reductie-bepalingen per dag verricht.

Ik heb op deze wijze van tal van glycose-oplossingen, urines en bloeddecocten bij verschillende verdunning het

reduceerend vermogen onderzocht, en daarbij onderling goed overeenstemmende uitkomsten verkregen. Alleen indien de urine of het bloeddecoct tot onder 0,005 % reduceerend vermogen verdund werd, vond ik de uitkomst meestal 0,001—0,003 % lager dan de berekende waarde.

Ter controle van de nauwkeurigheid der reductie-methode verrichtte ik nog de volgende bepalingen:

Van een urine van bekend reduceerend vermogen (0,157%, volgens NAGASAKI bepaald) werden verschillende, mij onbekende, hoeveelheden in maatkolfjes van 100 cc. geschonken en met water aangevuld. Uitkomsten:

Mengsel van urine en water: (urine reduceert 0,157 %)	Reduceerend vermogen:	
	gevonden:	berekend:
64 cc. urine + 36 cc. water.	0,098 %	0,100 %
40 » + 60 »	0,063	0,063
24 » + 76 »	0,041	0,038
33 » + 67 »	0,056	0,052
11 » + 89 »	0,017	0,017
10 » + 90 »	0,015	0,016
57 » + 43 »	0,090	0,089
4 » + 96 »	0,006	0,006

Voor bepalingen in urine verschillen de gevonden waarden dus enkele malen meer dan 0,001 % van de berekende. Dat komt, doordat bij titratie van urine soms (vooral wanneer de glycose-oplossing te snel wordt toegevoegd) het cupro-rhodanaat een geelbruine in plaats van een gele of witte kleur vertoont; en tegen het geelbruine neerslag is het verdwijnen van het laatste spoor van blauwe tint minder scherp te zien.

Bij de bepaling van het reduceerend vermogen van verdund bloeddecoct is (mits het decoct voldoende van

eiwit is bevrijd) het neerslag van het cupro-rhodanaat steeds lichtgeel tot wit van kleur, zoodat de kleuromslag scherper dan bij urinebepalingen is waar te nemen, en een kleinere gemiddelde fout kan worden bereikt. Voor het reduceerend vermogen van een bloeddecoct vond ik in 5 achtereenvolgende titraties: 0,079 — 0,079 — 0,078 — 0,079 — 0,078 %; gemiddeld: 0.079 % dus. Van dit bloeddecoct werden weer verschillende, mij onbekende, hoeveelheden met water vermengd:

Mengsel van bloeddecoct en water: (bloeddecoct reduceert 0,079 %)					Reduceerend vermogen:	
					gevonden:	berekend:
58 cc.	bloeddecoct	+ 42	cc.	water ..	0,045 %	0,046 %
15	»	+ 85	»	..	0,012	0,012
29	»	+ 71	»	..	0,022	0,023
100	»	+ 0	»	..	0,078	0,079
9	»	+ 91	»	..	0,007	0,007
4	»	+ 96	»	..	0,001	0,003

Dus: een fout van hoogstens 0,001 %, behalve wanneer het reduceerend vermogen lager is dan ± 0,005 %.

Deze uitkomsten gaven mij de zekerheid, dat ik van **10** cc bloeddecoct tot op 0,001 % nauwkeurig het reduceerend vermogen kon bepalen, indien dit 0,005—0,100 % bedraagt.

Ook bloeddecoct van 0,100—0,200 % is op deze wijze wel te bepalen; doch men moet er dan rekening mee houden, dat de daarvoor gevonden uitkomsten 0,001—0,003 % te hoog zijn; het is dus minstens even nauwkeurig (en ook zuiniger!): bloeddecoct, dat sterker dan 0,100 % reduceert, eerst met een gelijk volumen water te verdunnen. — Om urine van 0,100—0,200 % restre-

ductie volgens deze methode te kunnen bepalen, is het zelfs noodzakelijk, ze eerst met water tot onder 0,100 % te verdunnen. De reden hiervan is: dat bij het titreeren van geconcentreerde urine de bruine kleur en de onregelmatige praecipitatie van het cupro-rhodanaat storend werken op de waarneming van het eindpunt der titratie.

X.

Suikerbepalingen in menschenbloed.

Het totaal-reduceerend vermogen van menschenbloed bedraagt volgens de meeste onderzoekingen 0,07–0,11 %; de restreductie, indien bepaald volgens een daarvoor geschikte methode: 0,02–0,03 %.

Daar het, door de in het vorige hoofdstuk besproken wijziging van de reductie-methode van BENEDICT-NAGASAKI, mogelijk bleek, het reduceerend vermogen van 10 cc. bloeddecoct reeds van 0,005 % af nauwkeurig te bepalen, behoeft voor deze reductie-bepalingen het bloeddecoct dus niet meer sterk te worden ingedampt. Het is voldoende, het bloeddecoct te brengen op het oorspronkelijke volumen van het bloed (zoodat 10 cc. bloed per bepaling noodig is). Het is zelfs mogelijk — indien men met een nauwkeurigheid tot op 0,002 à 0,003 % genoegen neemt —: te volstaan met het verdunde bloeddecoct slechts tot 2 à 3 maal het oorspronkelijke volumen van het bloed te concentreeren, zoodat slechts 5 à 3 cc. bloed voor iedere bepaling wordt gebruikt.

Daar ik voor mijn onderzoekingen over gezonde, krachtige proefpersonen kon beschikken, heb ik bij iedere venaepunctie 40–80 cc. bloed aan de v. mediana cubiti ontnomen. Deze groote hoeveelheden gaven het voordeel, dat òf een aantal controle-bepalingen kon worden verricht, òf het bloed zoo ver kon worden ingedampt dat een nauwkeurigheid tot op 0,001 % bereikt werd, terwijl bovendien vaak bloeddecoct in voldoende hoeveelheid

en concentratie overbleef voor: zuivering met phosphor-wolfraamzuur, reductie-bepalingen na koken met 1 % HCl, osazon-bereiding, of pentose-reacties. Heeft men slechts ten doel, het reduceerend vermogen van het bloed voor en na gisting met T. monosa, tot op 0,002–0,003 % nauwkeurig, te bepalen, dan kan men voor deze methode met kleinere hoeveelheden punctaat (10–20 cc.) volstaan.

Ik behandelde het menschenbloed als volgt:

In een maatkolfje van 100 cc., waarin uit een pipet precies 10 cc. van een 1 %-kaliumoxalaat-oplossing gebracht is, wordt, onder zacht omschudden, 40–80 cc. bloed uit de punctie-naald opgevangen; onmiddellijk wordt het kolfje onder de waterkraan tot ± 15° afgekoeld, en de inhoud met gedistilleerd water uit een buret tot precies 100 cc. aangevuld; heeft men hiervoor *a* cc. water moeten gebruiken, dan was het volumen van het bloed dus *90–a* cc. *). Vijf minuten na de punctie wordt de inhoud van de maatkolf langzaam, onder omroeren, geschonken in een op de vrije vlam verwarmde porceleinen schaal, die — al naar de grootte der hoeveelheid bloed — 300 tot 500 cc. kokend gedistilleerd water met 20 tot 40 droppels 5 % azijnzuur bevat; het maatkolfje wordt zorgvuldig nagespoeld; tijdens het doorkoken worden nog zooveel droppels 5 % azijnzuur toegevoegd, dat de reactie ook na 10 minuten doorkoken zeer zwak zuur is tegenover lakmoes, en de vloeistof naast het coagulum er waterhelder en kleurloos uitziet. Dan wordt de geheele massa door middel van een zuigfilter door samengeperste pap van filtreerpapier gefiltreerd; het coagulum wordt

*) Deze nauwkeurige en snelle wijze van bepaling van het volumen van het bloed heb ik toegepast in navolging van Schenck [Pflügers Archiv **57**, 554 (1894)].

op het filter nog 2 maal door overgieten met water uitgewasschen, en daarna van het filter afgenomen en door een doek gecoleerd, welk coleeren nog 2 maal (telkens na aanmengen van het coagulum met water) herhaald wordt; colaat zoowel als spoelwater van alle gebruikte schalen, lepels, enz. (alles 2 maal nagespoeld) wordt door het zuigfilter gefiltreerd; ten slotte wordt ook dit zuigfilter 2 maal met water nagewasschen. Het aldus verkregen filtraat (700-900 cc.) wordt zonder verlies in een porceleinen schaal overgebracht en op het waterbad onder zachte verwarming bij zwak-zure reactie tot ± 60 cc. ingedampt, na filtratie door een vouwfilter in een maatkolfje van 100 cc. overgebracht, en met het spoelwater van schaal en filter weer tot 100 cc. aangevuld.

In aldus bereid decoct heb ik nu eerst nagegaan: hoeveel glycose het menschenbloed onder normale omstandigheden bevat, en of naast glycose nog aantoonbare hoeveelheden lactose of andere vergistbare reduceerende suikers erin voorkomen. Meestal gebruikte ik 2 × 10 cc. van de 100 cc. decoct voor de bepaling van het totaalreduceerend vermogen, en vergistte van de overblijvende 80 cc. 23 cc. met T. monosa, 23 cc. met S. cerevisiae en 33 cc. met lactosegist (¼ oogje gist is voldoende!); zoo kon ik dus 2 bepalingen doen van de totale reductie, en resp. 2, 2 en 3 van de restreductie (na eenige oefening kreeg ik met de benaderende bepaling in de meeste gevallen een even juiste uitkomst als met de definitieve).

Van 7 mannen en 4 vrouwen heb ik het suikergehalte van het bloed bepaald; van enkelen meer dan één maal; van de meesten in de morgenuren en buiten digestie: 11—16 uur na den laatsten maaltijd, terwijl in die uren niets dan water gebruikt was. Van sommige der proef-

personen heb ik ook volgens NAGASAKI's methode nagegaan, hoeveel mg glycose zij in de laatste 3—4 aan de punctie voorafgegane uren gemiddeld per uur in de urine hadden afgescheiden. De tabel op p. 133 geeft een overzicht van de verschillende bijzonderheden en uitkomsten.

Allereerst blijkt duidelijk (zie J. B. en A.B.), dat in den namiddag, enkele uren na den koffie-maaltijd, het glycose-gehalte van het bloed hooger is dan in den voormiddag bij nuchtere personen. Dit verschil berust hoogstwaarschijnlijk op de uit den darm geresorbeerde suiker, — misschien ook op een onafhankelijk daarvan bestaande dagelijksche schommeling van het glycose-gehalte van het bloed.

Buiten digestie, in den voormiddag tusschen 9 en 12 uur, bedraagt het gehalte van het bloed aan glycose: 0,047—0,082 %. Dit gehalte is dus ook onder deze voorwaarden nog vrij sterk wisselend, ook bij denzelfden persoon op verschillende dagen (zie H. P. en H. B.). — Er bestaat geen duidelijk verschil tusschen het glycose-gehalte van het bloed in de verschillende jaargetijden (in het afgeloopen jaar kwam echter noch langdurige warmte, noch langdurige koude voor); in verband met de vondst van DE LANGEN en SCHUT[1]), dat het bloedsuikergehalte in de Tropen 30–75 % hooger is dan in Europa — en wel blijkbaar tengevolge van de hoogere temperatuur —, zou n.l. in het gematigde klimaat in warme zomers een stijging, in strenge winters een daling van het bloedsuikergehalte misschien waarneembaar zijn. Merkwaardig is in dit opzicht alleen, dat in een koude week in December 1917 de laagste door mij waargenomen waarden voor het glycose-gehalte van het bloed gevonden

---

1) Gen. Tijdschr. v. Ned. Indië **56**, 490 (1916); **57**, 260 (1917).

Proefpersoon.	Leeftijd.	Datum (1917/'18).	Uur.	Aantal uren na laatsten maaltijd.	Totale reductie.	Reductie na gisting met:			Hoeveelheid glycose.	Glycose in de urine per uur (in milligrammen).
						T. monosa.	S. cerevisiae.	lactosegist.		
Mannen.										
J. B.	28	1 Juni	4u nam.	2	0,116 %	0,019 %	—	0,020 %	0,097 %	26,7 mg.
		13 »	1u nam.	16	0,089	0,020	0,021	0,021	0,069	2,5
		27 Sept.	9u v.m.	14	0,092	0,022	0,020	0,022	0,070	5,9
H. P.	22	23 Juni	12u v.m.	18	0,088	0,019	0,020	0,018	0,069	4,2
		15 Dec.	10u v.m.	12	0,072	0,025	—	0,024	0,047	—
H. D.	24	1 Juli	9u v.m.	12	0,080	0,022	—	0,021	0,058	3,2
H. B.	26	3 Oct.	10u v.m.	14	0,093	0,028	0,028	—	0,065	2,0
		17 »	9u v.m.	13	0,089	0,028	0,027	—	0,061	6,3
		26 »	10u v.m.	14	0,108	0,026	—	0,026	0,082	5,6
H. T.	25	26 Oct.	11u v.m.	15	0,087	0,023	0,022	—	0,064	4,7
H. G.	23	18 Dec.	9u v.m.	14	0,080	0,029	—	0,027	0,051	—
C. H.	33	25 Jan.	9u v.m.	11	0,098	0,031	0,030	0,030	0,067	—
Vrouwen.										
A. B.	21	6 Juni	2u nam.	1	0,113	0,022	0,021	0,022	0,091	—
		25 Jan.	10u v.m.	12	0,105	0,026	0,024	0,025	0,079	—
B. M.	40	10 Dec.	10u v.m.	12	0,096	0,021	0,020	0,019	0,075	—
C. K.	35	25 Febr.	9u v.m.	12	0,101	0,023	0,024	0,022	0,078	—
A. M.	27	25 »	10u v.m.	12	0,092	0,027	0,026	0,021	0,065	—

werden: op 15 Dec. bij H.P. 0,047 °/₀, en op 18 Dec. bij H.G. 0,051 °/₀. — Verder is nog opmerkelijk, dat ik de hoeveelheid glycose van het bloed bij mannen lager vond dan bij vrouwen: de gemiddelde waarden zijn resp. 0,064 en 0,074 °/₀. De groote wisseling van het glycose-gehalte in deze kleine reeks bepalingen staat echter niet toe, aan dit verschil veel waarde te hechten.

De restreductie na de vergisting met T. monosa bedraagt 0,019—0,031 °/₀.

Behalve bij A. M. is bij geen enkele persoon de rest-reductie van het bloed na vergisting met S. cerevisiae of met lactosegist duidelijk lager dan na vergisting met T. monosa: de gevonden waarden verschillen soms wel 0,001 of 0,002 °/₀, maar niet steeds in dezelfde richting. Bij deze geringe concentratie van het bloeddecoct wijst dus niets op de aanwezigheid van andere vergistbare reduceerende suikers dan glycose in normaal menschen-bloed.

A. M. is een primigravida (36 weken); in haar bloed komt ongetwijfeld lactose voor: 0,005—0,006 °/₀ reductie, dus bijna 10 mg lactose per 100 cc. bloed. — Terstond na de baring onderzocht ik ook het navelstrengbloed: 24 Maart, 9 uur 's avonds. Uit de navelstreng werd 27,1 cc. bloed verkregen:

Navelstrengbloed. Totale reductie:	Reductie na gisting met:		
	T. monosa.	S. cerevisiae.	lactosegist.
0,161 °/₀	0,057 °/₀	0,055 °/₀	0,048 °/₀

Hierin bevond zich dus 0,161—0,057 = **0,104** °/₀ glycose, en $^5/_3 \times 0{,}008 =$ **0,013** °/₀ lactose. Welke stoffen de abnormaal groote restreductie (0,048 °/₀) veroorzaken, heb

ik niet nader kunnen nagaan; voor reductie-bepaling na zuivering met PW b.v. was de hoeveelheid decoct ontoereikend. Het hooge glycose-gehalte en de groote restreductie kunnen zoowel van moederlijken als van foetalen oorsprong zijn. De vrouw had in het laatste etmaal nagenoeg geen voedsel gebruikt; de groote hoeveelheid glycose in het navelstrengbloed kan dus niet van uit den darm geresorbeerde koolhydraten afkomstig zijn.

Bij enkele der mannelijke proefpersonen heb ik voorts nog nagegaan: hoe groot de glycolyse in normaal menschenbloed (oxalaat-bloed) is, en hoe het bloedsuikergehalte van den nuchteren mensch verandert na een koolhydraat-rijken maaltijd.

Glycolyse. Sommige onderzoekers (FRANK[1]), BERGSMA[2]), e. a.) nemen het bloed niet terstond in bewerking, doch eerst na 15 minuten staan. Dit doen zij op voetspoor van LÉPINE, die zegt dat in de eerste 15 minuten de spontane vorming van »sucre immédiat« uit »sucre virtuel« de glycolyse overtreft, zoodat na 15 minuten het bloed zijn grootste gehalte aan door reductie te bepalen glycose bereikt.

Ik heb in 2 gevallen nagegaan, hoe de reductie van menschenbloed verandert, wanneer het, in plaats van 2 à 3 minuten, 15 minuten of 3 uren (bij 37 °) bleef staan. In één der 2 gevallen onderzocht ik ook de restreductie.

---

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chemie **70**, 129 (1910).

[2]) Het Bloedsuikergehalte en de Suikerstofwisseling tijdens de Zwangerschap, de Baring en het Kraambed. Diss. Leiden, p. 7 (1912).

Proefpersoon.	Datum en uur der punctie.	Bloed gekookt:	Totale reductie.	Reductie na gisting met:	
				T. monosa	lactosegist
H.P.	23 Juni 11u v.m.	na 2–3 min.	0,086 %		
		na 15 min.	0,081		
		na 180 min. bij 37°	0,044		
H.D.	1 Juli 9u v.m.	na 2–3 min.	0,080	0,022 %	0,021 %
		na 15 min.	0,077	0,022	0,022
		na 180 min bij 37°	0,058	0,023	0,022

In beide gevallen was het totaal reduceerend vermogen in de eerste 15 minuten reeds enkele duizendste procenten gedaald, m. a. w.: had de glycolyse reeds de (misschien aanwezige) vrijwording van gebonden suiker overtroffen. Ik heb daarom het bloed steeds zoo spoedig mogelijk afgekoeld en verder behandeld: 4 à 5 minuten glycolyse kan dan slechts een zeer geringe fout (bovendien bij alle bepalingen van ongeveer dezelfde grootte) veroorzaken.

Nadat de glycolyse bij 37 ° 3 uur geduurd had, was bij H.P. 0,042 %, bij H.D. 0,022 % glycose ontleed; de veel sterkere glycolyse in het eerste geval moet waarschijnlijk verklaard worden, doordat daar een stolsel in het bloed was ontstaan. De restreductie heeft tijdens de glycolyse geen verandering ondergaan.

Invloed van voeding met zetmeel. Het suikergehalte van het bloed werd bepaald buiten digestie, en 1 of 2 uren na een maaltijd, bestaande uit: 350 gram wit brood, boter en 200 cc. water. In de urine van de laatste 3 uren vóór en in die van de eerste 3 uren na den maaltijd werd nagegaan, hoeveel glycose gemiddeld per uur door de nieren was afgescheiden. Zie tabel p. 137.

Proefpersoon.	Datum en uur der punctie.	Totale reductie.	Reductie na gisting met:			Hoeveelheid glycose.	Aantal mg glycose in de urine per uur; *a*: vóór, *b*: na den maaltijd.
			T. monosa.	S. cerevisiae.	lactosegist.		
J. B. 13 Juni	Vóór maaltijd (1u nam.)	0,089 %	0,020 %	0,021 %	0,021 %	0,069 %	*a* 2,5 mg *b* 14,0
	2 uren erna (4u nam.)	0,126	0,025	0,024	0,022	0,101	
J. B. 27 Sept.	Vóór maaltijd (9u v.m.)	0,092	0,022	0,020	0,022	0,070	
	1 uur erna (11u v.m.)	0,095	0,022	0,023	0,022	0,073	*a* 5,9 *b* 8,9
	2 uren erna (12u v.m.)	0,096	0,023	0,022	0,024	0,073	
H. P. 23 Juni	Vóór maaltijd (11u v.m.)	0,086	—	—	—	—	
	Vóór maaltijd (12u v.m.)	0,088	0,019	0,020	0,018	0,069	*a* 4,2 *b* 11,4
	1 uur erna (2u nam.)	0,091	0,018	0,017	0,017	0,073	
H. D 1 Juli	Vóór maaltijd (9u v.m.)	0,080	0,022	—	0,021	0,058	
	1 uur erna (11u v.m.)	0,093	0,024	—	0,025	0,069	*a* 3,2 *b* 33,0
	2 uren erna (12u v.m.)	0,089	0,024	—	0,023	0,065	

Het glycosegehalte der urine is in alle gevallen na den maaltijd duidelijk toegenomen.

Een aanzienlijke stijging van glycosegehalte van het bloed is alleen in de eerste proef bij J. B. waar te nemen. Bij H.P. en H.D. daarentegen is de stijging veel geringer; — en evenzoo bij J. B., toen deze in de morgenuren in plaats van in den namiddag onderzocht werd. Dit laatste zou weer een invloed van het uur van den dag op den bloedsuikerspiegel doen veronderstellen, welke invloed dan veel grooter moet zijn dan die der voeding. Hoewel uit deze 4 waarnemingen over dit punt niets met zekerheid valt af te leiden, geven zij toch reden om bij het onderzoek naar den invloed van een

bepaalde omstandigheid op het bloedsuikergehalte steeds onder overigens gelijke voorwaarden van tijd te werken.

Na de resorptie van groote hoeveelheden zetmeel uit den darm blijkt het bloed toch geen aantoonbare hoeveelheid maltose, lactose, of andere vergistbare reduceerende suiker naast glycose te bevatten.

Bij H.P. bepaalde ik het totaal reduceerend vermogen van het bloed 2 maal bij nuchtere maag, om na te gaan, of het bloedverlies op zichzelf soms een merkbaren invloed op het suikergehalte van het bloed na 1 uur had. Hoewel bij de eerste punctie (11u v.m.) bijna 100 cc. bloed werd afgenomen, was het totaal reduceerend vermogen van het bloed om 12 uur nagenoeg onveranderd.

Invloed van voeding met rietsuiker.

Ik ging na : den invloed van het gebruik van 100 gram rietsuiker, opgelost in 300-400 cc. water.

Rietsuiker werkt in het geheel niet reduceerend op de oplossing van BENEDICT, ook niet na 6-10 minuten ermee gekookt te zijn. Om na te gaan, of na het gebruik van rietsuiker het bloed naast monosen ook onontlede rietsuiker bevatte, heb ik na de gisting met T. monosa en S. cerevisiae het bloeddecoct 30 minuten met 1 % HCl gekookt, en na neutraliseeren wederom het reduceerend vermogen bepaald; daar rietsuiker door T. monosa niet, door S. cerevisiae wel vergist wordt, moet de aanwezigheid ervan in het bloed blijken, doordat het met T. monosa vergiste bloeddecoct door koken met HCl sterker in reduceerend vermogen toeneemt, dan het gedeelte dat met S. cerevisiae vergist is.

De tabel op p. 139 geeft de uitkomsten. Alleen in proef II en III was het bloeddecoct vóór het koken met HCl door middel van PW gezuiverd. De hoeveelheid

Proefpersoon.	Datum en uur der punctie.	Totale reductie.	Reductie na gisting: T: met T. monosa, C: met S. cerevisiae.		Reductie na 30 minuten koken met 1 % HCl.	Hoeveelheid glycose.	Stijging der reductie door de hydrolyse.	Aantal mg glycose in de urine per uur; *a.* vóór, *b.* na het gebruik der rietsuiker.
I. H.B. 3 Oct.	Nuchter (10u v.m.)	0,093 %	T 0,028 % C 0.028		T 0,044 % C 0,046	0,065 %	T 0,016 % C 0,018	*a* 2,0 mg
	1 uur na gebruik van 100 gram rietsuiker (11u v.m.)	0,132	T 0,029 C 0,027		T 0,055 C 0,050	0,103	T 0,026 C 0,023	*b* 16,5
				Reductie na opvolgende zuivering met PW.				
II. H.B. 17 Oct.	Nuchter (9u v.m.)	0,089	T 0,028 C 0,027	T 0,014 C 0,013	T 0,017 C 0,018	0,061	T 0,003 C 0,005	*a* 6,3
	1 uur na gebruik van 100 gram rietsuiker (10u v.m.)	0,110	T 0,024 C 0,025	T 0,014 C 0,013	T 0,017 T 0,016	0,086	T 0,003 C 0,003	*b* 11,9
III. H.T. 26 Oct.	Nuchter (11u v.m.)	0,087	T 0,023 C 0,022	T 0,013 C 0,013	T 0,021 C 0,019	0,064	T 0,008 C 0,006	*a* 4,7
	1 uur na gebruik van 100 gram rietsuiker (12u v.m.)	0,114	T 0,025 C 0,024	T 0,015 C 0,014	T 0,024 C 0,024	0,089	T 0,009 C 0,010	*b* 15,3

glycose, vóór en na het gebruik der rietsuiker in de urine afgescheiden, staat weer in de laatste kolom vermeld.

Het gehalte van de urine en van het bloed aan glycose (+ misschien fructose) is in alle 3 gevallen aanmerkelijk gestegen.

Uit de cijfers, die de stijging der reductie door de hydrolyse met HCl aangeven (op één na de laatste kolom) valt te besluiten, dat in proef II en III 1 uur na de voeding met rietsuiker toch geen spoor onontlede rietsuiker in het bloed voorkwam. In proef I was misschien een kleine hoeveelheid rietsuiker in het bloed van 11u v. m. aanwezig (0,026—0,023=0,003 %); daar in deze proef het bloeddecoct te voren niet met PW gezuiverd was, moet de betrekkelijk groote stijging der restreductie tengevolge van het koken met HCl hier wel voor een deel op het vrij-worden van aan eiwit gebonden suiker berusten, — misschien ook op met PW praecipiteerbare dextrinen; ongetwijfeld waren deze verbindingen van suiker met eiwit (of dextrinen?) na de voeding met rietsuiker in grootere hoeveelheid in het bloed voorhanden dan daarvoor.

Werden (— wat niet in de tabel is aangegeven —) sommige van de met HCl gekookte porties bloeddecoct met T. monosa na-vergist, dan daalde het reduceerend vermogen weer ongeveer tot de waarde, die vóór de hydrolyse was gevonden; bij de hydrolyse ontstaan dus ook in menschenbloed geen andere reduceerende suikers dan monosen.

Proef II en III zijn de eenige, waarbij ik de **grootte der restreductie van menschenbloed na zuivering met phosphorwolfraamzuur** bepaalde: zoowel bij H.B. als bij H.T. bedraagt zij **0,013—0,014** %.

Invloed van het gebruik van melksuiker. Den invloed van het gebruik van melksuiker op het suikergehalte van het bloed heb ik slechts bij één persoon nagegaan. H.B. nam. 26 Oct. 1917, 's morgens om 10 uur, 80 gram lactose in (opgelost in ruim 1 L water). Even te voren en één uur later had de venaepunctie plaats:

		Totale reductie.	Reductie na gisting met:		Reductie glycose.	Reductie lactose.
			T. monosa.	lactosegist.		
H.B. 26 Oct.	Nuchter (10u v.m.)	0,108 %	0,026 %	0,026 %	0,082 %	0,000 %
	1 uur na gebruik van 80 gram melksuiker (11u v.m.)	0,115	0,035	0,029	0,080	0,006

Het bloed bevatte dus om 11 uur een geringe hoeveelheid lactose (10 mg per 100 cc.); het glycosegehalte was na het gebruik van melksuiker onveranderd.

De urine bevatte 's morgens vroeg (van 7—10u) 5,6 mg glycose per uur; door controlegisting met lactosegist kon ik mij tot overmaat van zekerheid ervan overtuigen, dat geen spoor van lactose in die urine voorkwam. Van 10—1 u nam. scheidde H.B. per uur 14,4 mg glycose en 39,0 mg lactose door zijn nieren uit.

In het met T. monosa vergiste gedeelte van het bloed, dat door de punctie van 11 u verkregen was, vond ik na koken met phenylhydrazine en warm filtreeren: geen osazonkristallen op het filter; galactose was dus afwezig. In het filtraat kristalliseerde na afkoeling een veel grootere hoeveelheid tot bollen gegroepeerde naalden (lactosazon) uit, dan in het met T. monosa vergiste gedeelte van het bloed van 10 u kon worden waargenomen.

J 2937

STELLINGEN.

I.

De meening van BIJWATERS, dat in het bloed een glycoproteïde voorkomt, is ongegrond.

II.

In de voedingsleer moet, bij de beantwoording der vraag betreffende de minimum hoeveelheid eiwit, ook het zwavelgehalte van het eiwit in aanmerking worden genomen.

III.

Het pigment der huid ontstaat bij de hoogere vertebraten uitsluitend in de epidermis.

IV.

De volumenvermeerdering van het pancreas door vagusprikkeling berust niet op verwijding der bloedvaten, maar op stuwing van pancreassap.

V.

De pulsaties der slagaderen zijn van groote beteekenis voor de voortbeweging van het bloed in de aderen.

VI.

De vorm van het kamerelectrogram hangt voornamelijk af van de snelheid, waarmee de prikkel wordt voortgeleid.

VII.

Door de proeven van ENGELMANN wordt niet bewezen, dat contractiliteit en geleidingsvermogen twee verschillende eigenschappen van de spieren zijn.

VIII.

»Pernicieuse anaemie« is een symptomencomplex, geen op zichzelf staande ziekte.

IX.

De volgens KOELENSMID gewijzigde draadproef van EINHORN verdient aanbeveling als diagnosticum van ulcus ventriculi en ulcus duodeni.

X.

Physiologische waarde-bepaling van thyreoidpreparaten is nog niet mogelijk.

XI.

Typhusbacillendragers behandele men door toediening van kwik, gebonden aan cystine.

XII.

De groote cellen in den globus pallidus zijn homoloog met de groote pyramidencellen in de hersenschors.

XIII.

Osteochondritis dissecans is een zelfstandig ziektebeeld.

XIV.

Ten onrechte meent O. HOEHNE uit zijn onderzoek naar de aetiologie der extraüterine graviditeit te kunnen besluiten, dat de eicel zich nooit in een normale tuba FALLOPII nestelt.

XV

Het vocht der voorste oogkamer wordt door het corpus ciliare afgescheiden.