©Naturwiss. med. Ver. Innsbruck, download unter www.biologiezentrum.at

Ber. Nat.-Med. Ver. Innsbruck	Band 55	S. 179—185	Innsbruck, Juli 1967

Normalwerte zum Reduktionstest
Ein Beitrag zur Messung der Reduktionsintensität von Humanserum mittels Kaliumpermanganat

von

H. WACHTER, J. ZELGER und M. HÖLLWARTH

(Aus dem Institut für Medizinische Chemie [Vorstand: Univ.-Prof. Dr. R. STÖHR] und der Dermatologischen Klinik [Vorstand: Univ.-Prof. Dr. J. KONRAD] der Universität Innsbruck)

Synopsis: A colorimetric method using potassium permanganate was used to determine the reduction intensity or redox-potential of the sera of healthy persons. The following four groups were tested: a group of students, age 18—25 years, a group of sport champions, age 16—25 years, a further group of sport champions, age 25—53 years and a group of persons with minor skin alterations, age 12—75 years.

Wir wissen heute, daß das Redox-Milieu für die lebende Zelle von wesentlicher Bedeutung ist. Es gibt kaum eine Leistung der Zelle, die nicht durch das Redoxpotential des Milieus gesteuert wird. Ein unübersehbares Schrifttum zeugt von der Wichtigkeit biologischer Redoxprobleme. Einblick in diese kann am sichersten durch Potentialmessung auf elektrometrischem Wege gewonnen werden. Durch neuere Methoden (ZIEGLER 1960) kann im Blut, in vivo und in vitro, das Redoxpotential verläßlich gemessen werden. Indirekte Methoden, mit deren Hilfe auf kolorimetrischem Wege durch Farbstoffe das Redoxpotential von organischen Substraten ebenfalls ermittelt werden kann, sind weniger genau, aber dafür auch apparativ nicht so aufwendig und weniger kostspielig. Auch sie vermitteln hinreichend Einblick in die Redoxpotentiallage der zu untersuchenden Systeme. So konnte vielfach nachgewiesen werden, daß die Redoxpotentiallage des menschlichen Blutes durch verschiedene Erkrankungen wesentlich beeinflußt wird (ZIEGLER 1960).

Um für die praktische Medizin eine leicht durchführbare und nicht kostspielige Untersuchungsmethode zur Ermittlung der Veränderungen des Redoxpotentials von Humanserum bzw. seiner Redoxkapazität zu ermöglichen, haben wir einen einfachen Reduktionstest ausgearbeitet (WACHTER 1965a).

Dabei wurden die Versuchsbedingungen so gewählt, daß die Reduktionsintensität bzw. Redoxkapazität des hochmolekularen Anteils des menschlichen Serums

©Naturwiss. med. Ver. Innsbruck, download unter www.biologiezentrum.at

gemessen wird, der vorwiegend für die Lage des Serum-Redoxpotentials verantwortlich ist. Die dialysierbaren Anteile des Serums haben nach unserer Versuchsanordnung keinen wesentlichen Einfluß auf die Reduktion (WACHTER 1965a). Durch die auf diese Weise durchgeführte Messung der Reduktionsintensität gewinnen wir einen annähernden Einblick in die Redoxpotentiallage des entsprechenden Systems. Wir beziehen nun das ermittelte Reduktionsvermögen nicht auf die herkömmliche Redoxpotentialskala, sondern bringen zur Vereinfachung des Testes das Reduktionsvermögen in Beziehung zu einem willkürlich aufgestellten Reduktionsstandard.

Zur Prüfung der Reduktionsintensität des Serums verwenden wir Kaliumpermanganat in saurer Lösung. Dabei titrieren wir aber nicht mit Kaliumpermanganat, sondern geben $KMnO_4$ in genau ausgewogenem Überschuß zu und messen kolorimetrisch die auf Redoxeinflüsse sehr empfindlich reagierende kolloidale Braunsteinbildung. Das Prinzip dieser Methode kann ebenso zur vergleichenden Messung der Reduktionsintensität von papierelektrophoretisch aufgetrennten Serumfraktionen (WACHTER 1963, 1964 a u. b, 1965 b u. c) sowie auch zur Messung der Reduktionsintensität anderer Körperflüssigkeiten herangezogen werden. Mit Hilfe dieser Methode konnten wir in Übereinstimmung mit verschiedenen anderen, auf elektrometrischem Wege durchgeführten Redoxpotentialmessungen krankheitsbedingte bzw. durch physiologische Umstellung oder auch durch äußere Einflüsse bedingte Redoxpotentialveränderungen des menschlichen Serums auf einfachstem Wege nachweisen (WACHTER 1964 a).

Aufgabe der vorliegenden Arbeit sollte es sein, mit Hilfe unserer Methodik an einem Personenkreis von Gesunden Normalwerte des Reduktionsvermögens des Gesamtserums zu erheben.

Material

Der untersuchte Personenkreis umfaßte jugendliche Studierende im Alter von 18—25 Jahren (A), Sportler im Alter von 16—53 Jahren (B u. C) und weiters eine Gruppe von 12—75jährigen (D) mit geringfügigen, das Allgemeinbefinden nicht beeinflussenden Hautveränderungen, wie z. B. vulgäre Warzen, Alterswarzen, Nageldystrophien, Tätowierungen und Atherome.

Zur Untersuchung der Reduktionsintensität wurde nur frisches, hämolysefreies und nicht lipämisches Nüchternserum verwendet, welches zur Ausschaltung des Einflusses von Luftsauerstoff unter Stickstoff aufbewahrt wurde. Die Blutentnahme selbst erfolgte mittels innen polierter V_2-A-Kanülen. Alle Glasgeräte, die mit dem Untersuchungsmaterial in Berührung kamen, wurden gründlichst gereinigt.

Methodik

Zur Durchführung des Testes werden in eine Schliffeprouvette 6,0 ml Kaliumchloridpuffer eingebracht, dazu 3,0 ml 0,025 N Kaliumpermanganatlösung zugegeben, gut durchgemischt und im Thermostaten auf 20° C vorgewärmt. Zu diesem gebrauchsfertigen Oxydationsreagens wird nun mit einer Mikropipette diejenige Menge Serum zugegeben, welche einer Serummenge von 0,100 ml mit dem Eiweißgehalt von 7,00 g % entspricht. Dies wird so bewerkstelligt,

©Naturwiss. med. Ver. Innsbruck, download unter www.biologiezentrum.at

Tabelle 1

Gesamteiweiß in g%	Entsprechende Serummenge in ml	Gesamteiweiß in g%	Entsprechende Serummenge in ml
4,0	0,1750	6,6	0,1060
4,1	0,1707	6,7	0,1044
4,2	0,1666	6,8	0,1029
4,3	0,1627	6,9	0,1014
4,4	0,1590	7,0	0,1000
4,5	0,1555	7,1	0,0985
4,6	0,1521	7,2	0,0972
4,7	0,1489	7,3	0,0958
4,8	0,1458	7,4	0,0945
4,9	0,1428	7,5	0,0933
5,0	0,1400	7,6	0,0921
5,1	0,1372	7,7	0,0909
5,2	0,1346	7,8	0,0897
5,3	0,1320	7,9	0,0886
5,4	0,1296	8,0	0,0875
5,5	0,1272	8,1	0,0864
5,6	0,1250	8,2	0,0853
5,7	0,1228	8,3	0,0843
5,8	0,1206	8,4	0,0833
5,9	0,1186	8,5	0,0823
6,0	0,1166	8,6	0,0813
6,1	0,1147	8,7	0,0804
6,2	0,1129	8,8	0,0795
6,3	0,1111	8,9	0,0786
6,4	0,1093	9,0	0,0777
6,5	0,1076	9,1	0,0769

Tabelle 1: Umrechnungstabelle zur Ermittlung der anzuwendenden Serummenge für den Reduktionstest.

Nach Ermittlung des Gesamteiweißgehaltes des Serums kann aus der Tabelle direkt die Menge Serum in ml abgelesen werden, die zum Oxydationsansatz zugegeben werden muß. Treten bei der Bestimmung des Gesamteiweißes Hundertstel g% auf, so wird die genaue Serummenge, welche zugegeben werden muß, jeweils durch Interpolation errechnet.

daß vorerst das Gesamteiweiß bestimmt wird; entsprechend dem Gesamteiweiß kann aus Tabelle 1 die Serummenge abgelesen werden, welche zugesetzt werden muß. Durch diese einfache Manipulation haben wir unsere Untersuchung der Reduktionsintensität des Gesamtserums auf 7,00 g% Eiweiß bezogen. Die minimale Volumsänderung, die wir bei dieser Vorgangsweise unberücksichtigt lassen, fällt bei der Photometrierung des großen Endvolumens von 9,00 ml nicht ins Gewicht. Beim Zupipettieren des Serums werden die Zehntausendstel ml geschätzt, die Pipette ausgeblasen und jeweils 3 mal mit dem vorgelegten Oxydationsreagens nachgewaschen. Nach Zugabe des Serums wird der Ansatz durchgemischt und verschlossen

©Naturwiss. med. Ver. Innsbruck, download unter www.biologiezentrum.at

durch 30 Minuten im Thermostaten bei 20° C gehalten. Dabei wird das Kaliumpermanganat teilweise zu Mn(II)-Verbindungen und zu Braunstein reduziert; letzterer wird in kolloidaler Form in Lösung gehalten. Nach genau 30 Minuten wird der Inhalt der Reagensgläser durch 2- bis 3maliges Umdrehen gründlich gemischt und gegen destilliertes Wasser unter Verwendung eines Grünfilters (500—570 mμ) bzw. bei 500 mμ photometriert*.

Kaliumchloridpuffer, p_H 1,4: 3,725 g KCl (Merck, p. a.) werden in einem 1000-ml-Meßkolben in etwas destilliertem Wasser gelöst, mit 41,5 ml N HCl (Merck, p. a.) versetzt und auf 1000 ml mit destilliertem Wasser aufgefüllt. Anschließend wird durch eine Glasfrittennutsche (Korngröße 4) filtriert, um die Pufferlösung vollkommen von etwaigem organischen Fasermaterial zu befreien.

Kaliumpermanganatlösung: 0,025 N $KMnO_4$-Lösung, F = 1,0, vollkommen frei von etwaiger Braunsteinabscheidung.

Voraussetzung reproduzierbarer Untersuchungsergebnisse zur Messung der Reduktionsintensität von Gesamtserum ist die strikte Einhaltung von Zeit, Temperatur und Eiweißmenge.

Standardisierung:

Zur Erstellung der Standardeichkurve verwenden wir ebenfalls eine in kolloidaler Form in Lösung gehaltene Braunsteinabscheidung. Die Reduktion des Kaliumpermanganates erfolgt durch Thymol in gepuffertem, schwach alkalischem Milieu.

Reagenzien:

Puffer, p_H 7,55:

In einem 500-ml-Meßkolben werden 1,38 g Veronal und 1,03 g Veronal-Natrium und 250 mg Gummi arabicum (DAB 6-Waren) eingebracht, wobei eine möglichst kleine Menge kalten dest. Wassers verwendet werden soll. Es werden nun ca. 300 ml kochendes dest. Wasser zugegeben, wobei die Substanzen beim Umschwenken leicht in Lösung gehen. Nach Abkühlung auf Zimmertemperatur wird mit dest. Wasser bis zur Marke aufgefüllt.

Reduktionsmittel, 1 %ige (g/v) alkoholische Thymollösung: Es wird 1,0 g gereinigtes Thymol in einen 100-ml-Meßkolben eingebracht und mit 96 %igem Äthylalkohol auf ein Endvolumen von 100 ml aufgefüllt.

0,025 N $KMnO_4$-Lösung, F = 1,0:

Zur Erstellung des Standards wird die für den Test verwendete $KMnO_4$-Lösung herangezogen.

Reduktionsreagens:

Ca. 80 ml des oben beschriebenen Puffers (p_H 7,55) werden in einen 100-ml-Meßkolben eingebracht, mit 1 ml alkoholischer 1 %iger Thymollösung versetzt, mit Puffer bis zur Marke aufgefüllt und gut durchgemischt.

Erstellung der Standardeichkurve:

Entsprechend der Tabelle 2 werden die Reagenzien bei Zimmertemperatur zu jeweils 6 ml Reduktionsreagens gegeben, gut durchgemischt und nach 5 Minuten gegen dest. Wasser wie oben photometriert.

Werden in einem Koordinatensystem die so erhaltenen Extinktionen auf der Ordinate und die entsprechenden Reduktions-Einheiten auf der Abszisse aufgetragen, so erhalten wir eine Standardeichkurve (Abb. 1), aus der die jeweiligen Reduktionswerte direkt abgelesen werden können. Die Berechnung kann auch nach üblicher Gleichung erfolgen:

$$\frac{E_A}{E_S} \times 10 = \text{Reduktions-Einheiten}$$

E_A = Extinktion bzw. Photometerablesung der Analyse
E_S = Extinktion bzw. Photometerablesung der Standardprobe (Reagensglas 1)

* Wir verwendeten für unsere Untersuchungen das KLETT-SUMMERSON Photoelectric Colorimeter.

©Naturwiss. med. Ver. Innsbruck, download unter www.biologiezentrum.at

Tabelle 2

Reagens-gläser	Reduktions-reagens	dest. H_2O	0,025n $KMnO_4$	Photometer-ablesung	Reduktions-Einheiten
1	6 ml	0,4 ml	0,1 ml	31	10
2	6 ml	0,3 ml	0,2 ml	62	20
3	6 ml	0,2 ml	0,3 ml	93	30
4	6 ml	0,1 ml	0,4 ml	124	40
5	6 ml	—	0,5 ml	155	50

Tabelle 2: Erstellung der Standardeichkurve. Photometriert wird jeweils nach 5 Minuten.

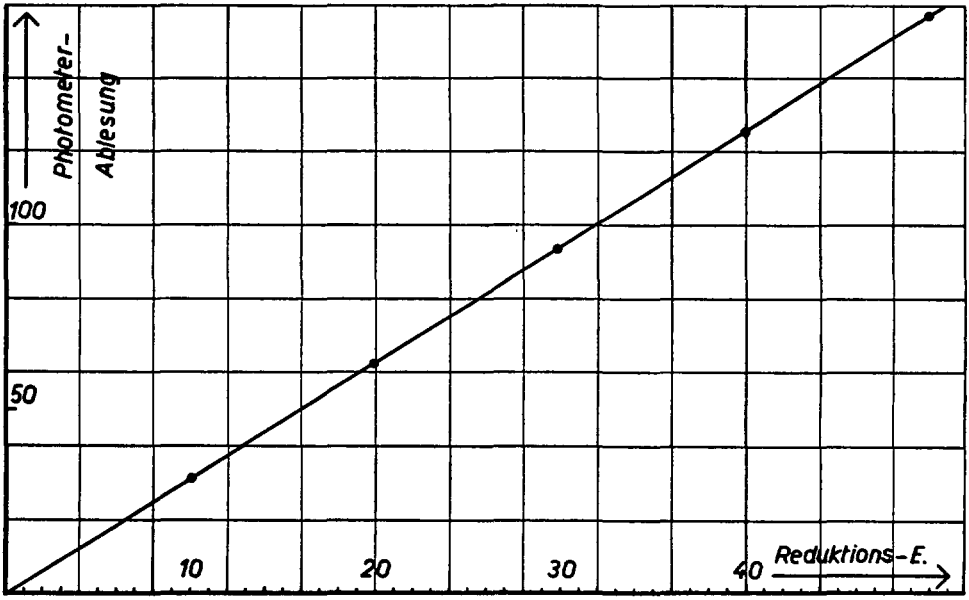

Abbildung 1: Standardeichkurve zur Errechnung der Reduktions-Einheiten.

©Naturwiss. med. Ver. Innsbruck, download unter www.biologiezentrum.at

Ergebnisse und Diskussion

In Tabelle 3 sind die Ergebnisse unserer Untersuchungen der Reduktionsintensität des menschlichen Serums, gruppenmäßig aufgeteilt, zusammengefaßt.

Beim Vergleich der Mittelwerte der Gruppen A, B und C ergibt sich eine genaue Übereinstimmung der Reduktionsintensität. Lediglich die Streuung nimmt bei den Sportlern der Gruppen B und C in gleicher Weise zu. Dies dürfte darauf zurückzuführen sein, daß die Blutentnahme jeweils vor einem zu erwartenden Wettkampf durchgeführt wurde. Die individuelle Stimmungslage bzw. nervliche Belastung der Probanden dürfte die Streuungsbreite der Ergebnisse wesentlich beeinflußt haben. Gruppe D zeigt bei steigender Streuungsbreite eine Verminderung der Reduktionsintensität des Serums. Die Erhöhung der Streuungsbreite ist bedingt durch einen inhomogenen Personenkreis, die Verminderung der Reduktionsintensität dürfte altersbedingt sein.

Tabelle 3

Gruppe	Geschl.	Alter	N	Reduktions-Einheiten	
A	♂+♀	18—25	25	$\bar{x}$	34,1
				s	±1,4
B	♂+♀	16—25	32	$\bar{x}$	34,2
				s	±3,4
C	♂	25—53	25	$\bar{x}$	34,2
				s	±3,5
D	♂	12—75	33	$\bar{x}$	37,9
				s	±4,4

Tabelle 3: Statistische Zusammenfassung der Ergebnisse der Messung der Reduktionsintensität von Seren von Normalpersonen.

A: Jugendliche Studierende.
B und C: Hochleistungssportler.
D: Probanden mit banalen Hautveränderungen.
N = Anzahl der Fälle; $\bar{x}$ = Arithmetisches Mittel; s = Standardabweichung.

Literatur

WACHTER, H. (1963): Über die Sichtbarmachung von Eiweißfraktionen nach Papierelektrophorese durch ihre Reduktionswirkung. Hoppe Seyler's Zschr. physiol. Chem. **333**: 256—259.

WACHTER, H. (1964a): Ein Beitrag zur Messung der Reduktionsintensität von Gesamtserum und elektrophoretisch aufgetrennten Serumfraktionen. Wien. klin. Wschr. **76**: 596—599.

WACHTER, H. (1964b): Über die Sichtbarmachung von Eiweißfraktionen nach Papierelektrophorese durch ihre Reduktionswirkung (Redoxogramm). H. Peeters, Protides of the Biological Fluids, Vol. **11**: 364—367, Elsevier, Amsterdam.

©Naturwiss. med. Ver. Innsbruck, download unter www.biologiezentrum.at

WACHTER, H. (1965a): Ein einfaches Verfahren zur Prüfung der Reduktionsintensität des Serums. Wien. klin. Wschr. **77**: 443—445.
WACHTER, H. (1965b): Weitere Ergebnisse zum Redoxogramm. H. Peeters, Protides of the Biological Fluids, Vol. **12**: 438—441, Elsevier, Amsterdam.
WACHTER, H. (1965c): Normalwerte zum Redoxogramm. Wien. klin. Wschr. **77**: 208—213.
ZIEGLER, E. (1960): Messung und Bedeutung des Redoxpotentials im Blut in vivo und in vitro. Arzneimittel-Forschung, 10. Beiheft: 1—126, Editio Cantor, Aulendorf i. Württemb.

Anschriften der Verfasser:

Univ.-Doz. Dr. Helmut WACHTER und Michael HÖLLWARTH, Institut für Medizinische Chemie der Universität Innsbruck, A-6020 Innsbruck, Müllerstraße 44.

Univ.-Doz. Dr. Josef ZELGER, Dermatologische Klinik der Universität Innsbruck, A-6020 Innsbruck, Anichstraße 35.

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: Berichte des naturwissenschaftlichen-medizinischen Verein Innsbruck

Jahr/Year: 1967

Band/Volume: 55

Autor(en)/Author(s): Wachter Helmut

Artikel/Article: Normalwerte zum Reduktionstest. Ein Beitrag zur Messung der Reduktionsintensität von Humanserum mittels Kaliumpermanganat. 179-185