

## Beiträge zur Physiologie der Milchsäure.

Von Dr. P. Spiro.

(Aus dem Physiologisch-chemischen Institut der Universität Strassburg.)

Schon seit längerer Zeit ist in der Physiologie die Ansicht in Geltung, dass neben den Oxydationsprocessen im Thierkörper auch fermentative Prozesse vor sich gehen, aber die Abgrenzung dieser Prozesse von einander und ihre gegenseitigen Beziehungen sind erst unlängst durch die Untersuchungen von Prof. Hoppe-Seyler eingehender verfolgt. <sup>(1)</sup> Seine Experimente haben zu der Anschauung geführt, dass eine grosse Anzahl von Processen, die man im Thierkörper beobachtet, in einer ganz ähnlichen Weise verlaufen, wie die Fäulnissprocesse an der Luft. Es waren von ihm dabei einige Substanzen untersucht, die bei der Fäulniss die natürlichen Produkte liefern, in welche sie beim Durchgang durch den thierischen Organismus zersetzt werden. Es ist aber noch nicht für alle von ihm untersuchten Substanzen festgestellt, ob und wo sie im Körper ein Ferment treffen, welches im Stande wäre sie ähnlich wie das Fäulnissferment zu spalten. Zu solchen Substanzen gehört z. B. die Milchsäure. Es wird zwar fast allgemein angenommen, dass die Milchsäure im Blute zu  $\text{CO}_2$  und  $\text{H}_2\text{O}$  oxydirt wird; da es aber im Blut keinen activen Sauerstoff giebt, so kann die Zersetzung der Milchsäure im Körper nicht auf so einfache Weise erklärt werden. Vielmehr ist anzunehmen, dass die Milchsäure erst durch ein Ferment gespalten wird in Buttersäure, Kohlensäure und Wasserstoff, und dieser letztere in statu nascendi den Sauerstoff des Blutes in den activen Zustand versetzt, indem er ein Atom von dem Molecül  $\text{O}_2$  in Beschlag nimmt und das andere Atom dabei frei wird.

<sup>(1)</sup> Arch. f. d. G. Physiologie. Bd. XII, S. 1.

Wo wird die Milchsäure auf diese Weise zersetzt? Mit anderen Worten: wo trifft sie, in den Organismus gelangt, ein Ferment, welches sie ähnlich dem Fäulnisfermente spaltet? Angeregt von Prof. Hoppe-Seyler stellte ich einige Versuche in dieser Richtung mit frisch aus der Ader gelassenem Blut an. Dabei verfuhr ich auf folgende Weise: Das Blut aus der art. carotis eines Hundes wird in ein Gefäß aufgefangen, welches 100 CC. einer 1% Lösung von reinem milchsaurem Kalk auf 40° erwärmt enthält. Dieses Gemenge wird im Brütöfen bei 40° 1½ bis 1 Stunde lang ruhig stehen gelassen. Nach dieser Zeit wird aus dem Blut die Milchsäure (nach dem Verfahren von Wislicenus<sup>1)</sup>) dargestellt. Die ganze Portion wird mit dem 4—5 fachen Volumen Alkohol übergossen und nach vorherigem sorgfältigem Zerreiben des Blutgerinnsels unter öfterem Umschütteln 24 Stunden stehen gelassen. Dann wird die alkoholische Lösung abfiltrirt und der Alkohol abdestillirt, nach Verdunsten der alkoholischen Lösung der Rückstand mehrmals mit Aether gut ausgeschüttelt; dadurch wird er von Cholesterin, Fetten, Lecithin u. a. befreit. Jetzt wird das milchsaure Salz durch Schwefelsäure zerlegt und die freie Milchsäure mit Aether ausgezogen. Nach Verdampfung des Aethers wird durch Kochen mit frisch bereitetem Zinkoxydhydrat milchsaures Zink dargestellt; dieses in Wasser aufgenommen, filtrirt, die Lösung eingedampft und zur Krystallisation stehen gelassen. Nach dem Trocknen über Schwefelsäure wird durch Erhitzen auf 110—120° während ca. 3 Stunden die Menge des Krystallwassers in der Substanz und dann die Menge des Zn (als Zn S nach der Methode von Rose dargestellt) bestimmt. Aus der Menge des Zn wird die Menge des milchsauren Zinkes und daraus endlich die Menge des milchsauren Kalkes berechnet, welche der Zerlegung entgangen ist.

#### Versuch I.

400 CC. Blut mit 1 Gramm milchsaurem Kalk eine halbe Stunde bei 40° gehalten, lieferten nach oben geschilderter Weise behandelt 0,458 gm. Substanz (milchsaures Zink?) Diese

(<sup>1</sup>) Ann. d. Chem. und Pharm. Bd. 167, S. 302.

Substanz enthielt 0,078 Krystallwasser, also 17,2% (das milchsäure Zink enthält nach der Berechnung 18,18%) und 0,0985 Zn, also 0,368 milchsäures Zink oder 0,330 milchsäuren Kalk.

Dieser Versuch scheint dafür zu sprechen, dass die Milchsäure im Blut zersetzt wird. Wer aber mit der Extraction des Blutkuchens zu thun gehabt hat, weiss wie schwer es ist ihn vollständig zu erschöpfen. Um diese Seite unseres Verfahrens zu prüfen, stellte ich folgenden Controlversuch an.

## Versuch II.

Es werden von einem Hund zwei Portionen Blut in zwei Gefässen mit 100 CC. einprocentiger Lösung von milchsäurem Kalk aufgefangen. Das Blut in einer Portion (A) wird beim Herausfliessen geschlagen und nach einstündigem Stehen bei 40° verarbeitet. Das Blut der anderen Portion (B) wird nicht geschlagen, sondern gleich nach der Gerinnung mit Alkohol übergossen und sofort in Arbeit genommen, also ohne das Blut auf das milchsäure Salz einwirken zu lassen.

1. Portion A.: 330 CC. Blut lieferten 0,702 Substanz mit 17,8% Krystallwasser und 0,1816 Zn; das entspricht 0,680 milchsäurem Zink oder 0,610 milchsäurem Kalk.

2. Portion B.: 425 CC. Blut lieferten 0,177 Substanz mit 17,5% Krystallwasser und 0,0335 Zn, entsprechend 0,125 milchsäurem Zink oder 0,112 milchsäurem Kalk.

Dieser Versuch zeigt sehr deutlich, wie schwer es ist aus dem Blutkuchen eine gelöste Substanz vollständig zu gewinnen. Die Thatsache aber, dass eine verhältnissmässig grosse Quantität Milchsäure aus der Portion A (mit dem Blute 1 Stunde gestanden) gewonnen worden ist, kann auch auf eine andere Weise gedeutet werden. Man kann nämlich denken, dass nicht nur bei der spontanen Gerinnung das milchsäure Salz in das Fibrin so zu sagen eingezogen wird, sondern dass auch das gesuchte Ferment, (welches eventuell die Milchsäure spaltet), beim Schlagen des Blutes mit dem Fibrin niedergerissen wird. Folgender Versuch spricht aber

noch entschiedener für die erst ausgesprochene Auffassung der Verminderung der Menge des milchsäuren Salzes nach dem Stehen mit Blut.

### Versuch III.

Die Canüle, welche in die Carotis eingeführt wird, ist mit einer gabelig getheilten Röhre verbunden. Das Blut fließt gleichzeitig in zwei Gefäße, welche mit 100 CC. einprocentiger Lösung unseres Salzes versehen sind. Beide Portionen enthalten gleiche Quantitäten Blut — 325 CC. und beide werden der spontanen Gerinnung überlassen. Eine Portion (A) wird eine Stunde lang bei 40° gehalten, die andere (B) sofort in die Arbeit genommen.

1) Portion A lieferte 0,339 Substanz, mit 17,1% Krystallwasser und 0,0583 Zn was 0,197 milchs. Zn<sup>d</sup> oder 0,175 milchsäuren Kalk entspricht.

2) Portion B lieferte 0,372 Substanz, mit 17,47% Krystallwasser und 0,067 Zn was 0,249 milchs. Zink oder 0,223 milchs. Kalk entspricht.

Vielleicht kann man bei noch längerem, sorgfältigerem Extrahiren des Blutes mit Alkohol mehr Substanz bekommen, als es bei mir der Fall war, ich glaube aber nicht viel mehr. Dieses Nebenergebniss scheint mir nicht ohne Wichtigkeit zu sein; es ist dasselbe jedenfalls bei quantitativen Analysen geronnener Flüssigkeiten zu berücksichtigen. Was unsere obengestellte Frage anbetrifft, so sprechen diese Versuche mit grosser Wahrscheinlichkeit dafür, dass das eben aus der Ader gelassene Blut allein für sich nicht die Fähigkeit besitzt Milchsäure zu zersetzen. Diese Meinung ist, wie bekannt, schon von Scheremetiewsky auf Grund von Untersuchungen anderer Art, die er im Laboratorium von C. Ludwig angestellt hat, (1) ausgesprochen worden. Somit hat sich dieser Satz auch auf dem von mir eingeschlagenen Wege bestätigt.

Dieses Resultat veranlasste mich einige Versuche anzustellen über einen Gegenstand, welcher von unserer Frage

(1) Bericht über die Verhandl. der K. S. Acad. 1858, S. 154.

nicht weit entfernt liegt und bis jetzt nicht genügend aufgeklärt ist; ich machte einige Versuche das Blut eines tetanisirten Hundes auf Milchsäuregehalt zu prüfen. Es ist seit den Untersuchungen von du Bois-Reymond<sup>(1)</sup> bekannt, dass bei angestrenzter Muskelthätigkeit sich eine fixe Säure in den Muskeln bildet. Da im Muskelsafte von Berzelius und nachher auch von Liebig<sup>(2)</sup> Fleischmilchsäure gefunden wurde, so ist allgemein angenommen, dass die saure Reaktion der thätigen lebenden Muskeln durch Fleischmilchsäurebildung bewirkt wird. Ueber das Loos dieser fixen Säure im Organismus existiren nur Vermuthungen und zwar nicht ganz übereinstimmende. Während nach der verbreiteten Anschauung die Säure im Blute zersetzt wird, kann sie nach anderen Vermuthungen vielleicht auch an synthetischen Processen Theil nehmen<sup>(3)</sup>. Nach mündlicher Mittheilung von Prof. Hoppe-Seyler wusste ich, dass er im Blute eines tetanisirten Hundes keine Milchsäure gefunden hat. Dieses Blut hatte aber, wie ich ferner erfuhr, wenigstens einen Tag lang gestanden, bevor es auf Milchsäuregehalt untersucht war. Daher unterliess ich nicht diesen Gegenstand noch einmal zu prüfen.

#### Versuch IV.

Einem Hunde wird die art. carotis freipräparirt und die Electroden von einem du Bois'schen Schlittenapparat in der Kreuzgegend, nach Wegnahme der Haut, angelegt.

Der Hund wird während 1 $\frac{1}{4}$  Stunde mit kleinen Pausen tetanisirt mittelst an Stärke immer zunehmenden Induktionsschlägen. Am Tetanus betheiligen sich fast ausschliesslich die Muskeln der hinteren Extremitäten. 5 Minuten nach dem Ende der Reizung (weder die Sensibilität der Haut, noch die Reizbarkeit der Muskeln sind ganz aufgehoben)

<sup>(1)</sup> Monatsbericht der Berliner Academie 1859, S. 288.

<sup>(2)</sup> Chemische Untersuchung über das Fleisch. Heidelberg 1847.

<sup>(3)</sup> Hermann. Untersuchung über den Stoffwechsel der Muskeln 1867, S. 92.

wird das Blut aus der Carotis direct in ein Gefäss mit vorher abgemessenem Volumen Alkohol aufgefangen. Ich bekam 350 CC. Blut, welches nach derselben Bearbeitung wie in den vorigen Versuchen, 0,431 krystallisirte Substanz lieferte. Nach mehrmaligem Auswaschen mit kleinen Mengen kalten, absol. Alkohols wurde die Substanz mit heissem absol. Alkohol extrahirt, und nach dem Auskrystallisiren der beiden Portionen, sowohl der in Wasser als der in abs. Alkohol gelösten, der Krystallwasser- und der Zinkgehalt bestimmt.

Aus Wasser auskrystallisirte Substanz 0,248 gab 13,3% Krystallwasser und 23,87% Zn (0,222 milchsaures Zink.)

Aus Alkohol krystallisirte 0,146 Substanz mit 14,3% Krystallwasser und 22,96% Zn entspricht 0,125 milchs. Zink.

#### Versuch V.

Zwei Kaninchen werden auf die nämliche Weise tetanisirt; das eine während 1½ Stunden, das andere 1 St. 5'. Beide verloren nach dem Tetanisiren weder die Empfindlichkeit noch die Contractionsfähigkeit in den hinteren Extremitäten, welche fast ausschliesslich am Tetanus sich betheiligten. Das eine lieferte 75 CC. Blut (10' nach dem Ende der Reizung herausgelassen), das andere 55 CC. (20' nach der Reizung herausgelassen.) Beide Blutportionen wurde vereinigt und Milchsäure daraus gewonnen. Ich erhielt 1,232 Substanz. Nach Auswaschen der Krystalle mit kleinen Mengen kalten absol. Alkohol, wurde ein Theil davon (der reinste) auf Krystallwasser- und Zinkgehalt geprüft:

0,353 Substanz enthielten 13,59% Krystallwasser- und 15,25% Zn.

Die Mengen des Krystallwassers und des Zinks, die die erhaltenen Substanzen lieferten, entsprechen in einigen Versuchen ziemlich dem fleischmilchsauren Zink, welches schon nach der Krystallform vermuthet war. In beiden Versuchen ist der Krystallwassergehalt etwas höher und der Zinkgehalt niedriger gefunden, als fleischmilchsaures Zink verlangt (12,9% Krystallw. und 26,7% Zn.). Das hängt wohl von Verunreinigungen des Salzes durch Substanzen, die bei 120° zersetzt

werden, ab. Somit zeigen diese Versuche, dass nach angestrenzter Muskelthätigkeit im Blute Fleischmilchsäure in nicht unbeträchtlicher Menge zu finden ist. (1) — Ueber den Ort ihrer Zersetzung im Körper habe ich noch nicht Versuche angestellt. Es müssen wohl zunächst die Nieren und die Schweissdrüsen in dieser Richtung geprüft werden. (2). — Dagegen versuchte ich den Harn nach angestrenzter Muskelthätigkeit auf Milchsäuregehalt zu untersuchen. Die zwei letzten Versuche sprechen nämlich dafür, dass die Zersetzung der Fleischmilchsäure im Thierkörper bei Weltem nicht so rasch vor sich geht, wie es gewöhnlich angenommen wird. Es kann also vielleicht, bei grösserer Anhäufung der Milchsäure im Blut, ein Theil davon auch unzersetzt durch die Nieren ausgeschieden werden. Da kein Fall von Tetanus am Menschen zu meiner Verfügung stand, so beschränkte ich mich einstweilen auf die Untersuchung des Harnes nach gewöhnlichen Muskelanstrengungen. Leider konnte ich nicht an mir selbst einen derartigen Versuch anstellen. Zwei Herrn haben aber die Freundlichkeit gehabt sich einem derartigen Versuch zu unterziehen. — Die Muskelthätigkeit, die sie dabei ausführten, war bei dem einen vierstündiger Tanz, bei dem anderen vierstündiger Marsch (mit einer Ruhepause von  $\frac{3}{4}$  Stunden in der Mitte). Der erstere sammelte von Mitternacht

(1) Ein Probeversuch hat mir gezeigt, dass dieses unangenehme Experiment durch ein anderes Verfahren mit Vortheil ersetzt werden kann. Anstatt das ganze Thier zu tetanisiren, reize ich, bei abgeschlossener Circulation des betreffenden Blutbezirks, die peripherischen Enden der Fussnerven; das Blut wird von Zeit zu Zeit aus den v. v. iliacae aufgefangen und frisches aus der Aorta in die Fussgefässe eingelassen. Diese Einrichtung hat hauptsächlich den Vortheil, dass das Blut, nachdem es die Muskeln durchspült hat, kein anderes Organ des Körpers passirt.

(2) Was das normale Blut betrifft, so sind die älteren Angaben über Milchsäuregehalt desselben höchst zweifelhaft, da sie nur auf der Krystallform basirt sind. Leider ging eine Portion von normalem Blut, das ich auf Milchsäure untersuchte, durch einen Zufall verloren, so dass ich jetzt noch nicht im Stande bin darüber etwas anzugeben. Solche Quantitäten aber, wie ich beim Tetanus gefunden habe (mehr als  $\frac{1}{2}$ °), enthält das normale Blut gewiss nicht. —

(Anfang des Tanzen) bis 11 Uhr Morgens 375 CC. (A) Urin; von da an bis 11 Uhr Morgens des folgenden Tages — 1330 CC. (B). Der zweite sammelte von 11 Morgens (Anfang des Spaziergangs) bis 8 Morgens des anderen Tages 1650 CC. (A') und während der folgenden 24 Stunden 1495 CC. (B'). Alle Portionen wurden so bald als möglich nach dem Herauslassen mit  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  neutralisirt und auf dem Wasserbade erwärmt; dann fast bis zu Trockne eingedampft und mit Alkohol extrahirt. Die vereinigten Portionen AA' und BB' wurden nachher auf dieselbe Weise behandelt, wie das Blut in den oben geschilderten Versuchen. Die Substanzen, die ich nach der Bereitung des Zinksalzes erhielt, wurden mit kleinen Mengen absol. Alkohol und Aether gewaschen; es ist aber sehr schwer die Substanzen von harzartigen Stoffen, die dabei erhalten werden, zu befreien; ich kann auch nicht mit Gewissheit sagen, ob ich eine krystallisirte Substanz vor mir hatte; in Portion AA' schien es der Fall zu sein. Portion A + A' (2025 CC.) lieferte 0,073 Substanz mit 13,7% Krystallwasser und 18,3% Zn (entspricht 0,050 milchs. Zink.) Portion B + B' (2825 CC.) lieferte 0,032 Substanz mit 6,2% Krystallwasser und 23,0% Zn.

Ich bin weit davon entfernt diesen Probe-Versuch als einen entscheidenden anzusehen. Dennoch scheint er mir einer Wiederholung werth zu sein: einmal ist im Harn eine Säure mit in Wasser löslichem Zinksalz gefunden und dann stimmt auch die Substanz AA' nach der Menge des Krystallwassers mit fleischmilchsaurem Zink so ziemlich. Dass im Harn von Tage nach der Muskelthätigkeit (BB') auch ein Zinksalz gefunden ist, kann auf zweierlei Weise erklärt werden: Entweder kann eine derartige Säure gewöhnlich im Harn gebildet werden, oder es können geringe Quantitäten Milchsäure (oder einer anderen Säure) auch 24 Stunden nach angestrengter Muskelthätigkeit mit dem Harn noch ausgeschieden werden. (1)

(1) Das könnte entschieden werden durch die Untersuchung des Harns vor der Muskelarbeit, was in meinem Falle leider unmöglich war.