

## Ueber die Säurebildung und den Milchsäuregehalt der Muskeln.

Von Dr. Astaschewsky aus Kasan.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Strassburg).

(Der Redaktion übergeben am 7. August 1880).

Du Bois-Reymond<sup>1)</sup> hat bekanntlich gezeigt, dass die ganz frischen lebendigen Muskeln violettes Lakmuspapier gar nicht verändern. Aber wenn der Muskel seine Leistungsfähigkeit eingebüsst hat und todtenstarr geworden ist, dann reagirt er sofort sauer. Er ist sogar reich an Säure, denn die Flüssigkeit, welche jetzt aus dem Querschnitt sickert, färbt das blaue Lakmuspapier fast zwiebelroth.

Daraus ist nach Du Bois-Reymond ersichtlich, «dass in den Muskeln um die Zeit des Erstarrens Säure in ansehnlicher Menge frei wird.»<sup>2)</sup>

Aber ausser der postmortalen Säurebildung soll sich auch intra vitam, zufolge heftiger und anhaltender Muskelcontraktionen, ebenfalls Säure bilden. Wenn durch Reizung eines n. ischiadicus der betreffende Gastrocnemius des Frosches in Contraction gebracht wird, so findet man denselben oft, wenigstens stellenweise, entschieden sauer.<sup>3)</sup>

Am Besten gelingen diese Versuche an Kaninchen.

«Zerschneidet man einem Kaninchen den Ischiadnerven der einen Seite, vergiftet dasselbe mit Strychnin und schneidet unmittelbar nach oder besser noch während dem letzten Krampfanfalle die Wadenmuskeln beider Seiten aus, so findet man die ruhenden neutral, die tetanisirten auf's entschiedenste sauer.»<sup>4)</sup>

<sup>1)</sup> Monatsber. d. kgl. Preuss. Akad. d. Wissensch., 1860, S. 297.

<sup>2)</sup> Ibid., S. 298.

<sup>3)</sup> Ibid., S. 314.

<sup>4)</sup> Ibid., S. 317.

Welche Säure bedingt, nach Du Bois-Reymond, diese saure Reaction?

«Die rothen Flecken, welche durch Tetanus gesäuerte Muskeln auf blauem Lakmuspapier machen, sind von dauernder Beschaffenheit und die Siedhitze vermög über die dergestalt in den Muskeln entwickelte Säure ebensowenig, wie über die auf anderem Wege freigewordene. Die saure Reaction der angestregten Muskeln rührt folglich weder her von der nach Matteucci und Valentin reichlicher darin entwickelten Kohlensäure, noch von saurem phosphorsaurem Kali. Dass Fleischmilchsäure die Ursache derselben sei, wird noch dadurch wahrscheinlich gemacht, dass Berzelius aus den Muskeln gehetzten Wildes eine auffallend grosse Menge Milchsäure erhielt etc.»<sup>1)</sup>

Folwarczny<sup>2)</sup> extrahirte das frische Ochsenherz mit Weingeist und kam zu dem Schluss: «in frischen Muskeln sind weder freie Milchsäure noch milchsäure Salze enthalten» und folgerte: «die Versuche Du Bois-Reymond finden in dieser Untersuchung volle Bestätigung.»

Heidenhain<sup>3)</sup> bestimmte im Jahre 1864 die Quantitäten der Milchsäure in den Muskeln colorimetrisch, indem er sie mit einer gesättigten ClNa-Lösung, die mit violetter Lakmustinctur gefärbt war, extrahirte. Dabei fand er, dass die tetanisirten Muskeln, sowohl bei fortdauernder Blutcirculation, als auch bei Ausschluss derselben, Lakmustinctur stärker, als die ruhenden Muskeln röthen. Indem er die Muskeln verschiedene Lasten heben liess und dann nach der Färbung die Menge der Säure bestimmte, fand er: «die Curve der Säurebildung, auf die Abscisse der Belastungen bezogen gedacht, nimmt denselben Verlauf wie die Curve der lebendigen Kräfte.»<sup>4)</sup>

Ranke bestimmte die Quantität der Milchsäure in den Muskeln, indem er dieselben mit Wasser extrahirte und dann

<sup>1)</sup> Monatsber. d. kgl. Preuss. Akad. d. Wissensch. 1860, S. 321.

<sup>2)</sup> Wochenbl. d. Zeitschr. d. kaiserl. kgl. Gesellsch. d. Aerzte in Wien 1862, S. 25—28.

<sup>3)</sup> Mechanische Leistung etc. S. 146.

<sup>4)</sup> Ibid., S. 160.

mit Natronlauge titrirte. Er fand, abweichend von Heidenhain, dass «der tetanisirte Muskel weniger Säure erzeugt, als der geruhte. Der Tetanus des Muskels verbraucht säurebildenden Stoff.»<sup>1)</sup> Der Muskel besitzt, nach Ranke nach seiner Entfernung aus dem Blutkreislauf ein unveränderliches Säurebildungsmaximum.<sup>2)</sup>

Aus dem Erwähnten ist ersichtlich, dass wir bis jetzt noch keine Bestimmungen der Milchsäure in ruhenden und arbeitenden Muskeln besitzen, da es unbekannt bleibt, welche Säure Heidenhain und Ranke bestimmt haben.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist, diese Lücke auszufüllen.

Die Methode der Untersuchung war folgende:

Einem Kaninchen wurde das Rückenmark in der Höhe des unteren Brusttheils subcutan durchschritten und auch ein Ischiadicus. Letzterer wurde im Laufe von 35—60 Minuten mit Inductionsströmen gereizt, zufolge dessen die Muskeln in heftigen Tetanus versetzt wurden. Darauf wurde das Versuchsthier entweder durch den Nackenstich oder durch Verblutung rasch getödtet. Dann wurden die noch zuckenden Muskeln von beiden Hinterläufen entfernt, fein zerkleinert und, um postmortale Fermentation zu vermeiden, sofort in Kolben mit abgewogenen Mengen von absolutem Alkohol gebracht und nun gewogen. Hierauf wurden die Muskeln mit einem Theil desselben Alkohols in einen Porzellanmörser gebracht und darin möglichst fein zerrieben, abermals gewogen und dann zu jeder Portion so viel Alkohol zugefügt, bis jedes Gramm der ruhenden und tetanisirten Muskeln mit der gleichen Menge (5—6 gr.) Alkohol extrahirt wurde. Die Kolben wurden luftdicht zugestopft, im Laufe von 7—8 Tagen stehen gelassen, von Zeit zu Zeit geschüttelt. Nach 7—8 Tagen wurde der Alkohol abgegossen und die Muskeln abermals mit derselben Menge frischen Alkohols extrahirt. Nach 2—3 Tagen wurde dieselbe Procedur zum 3. Male wiederholt. Die gesammten Extracte wurden darauf filtrirt, das Fleisch auf dem

<sup>1)</sup> Tetanus, S. 150.

<sup>2)</sup> Ibid., S. 146.

Filter mit seinem 3fachen Volum Alkohol ausgewaschen und zuletzt in kleinen Portionen in eine grosse Menge siedendes Wasser eingetragen, worüber an einem anderen Orte ausführlich berichtet werden wird.

Von den vereinigten Alkoholextrakten wurde der Alkohol abdestillirt, der Rest im Becherglase auf dem Wasserbad bis zur Trockene eingedampft, 35 Minuten lang im Luftbad bei  $100^{\circ}$  C. getrocknet und gewogen, — das Gewicht ergibt die Menge des Alkoholextractes. Dann wurde das Alkohol-extract mit 12—15 CC. Wasser aus dem Glase ausgespült, in einen Kolben gebracht und mit grossen Portionen Aether behandelt, um die freie Milchsäure zu extrahiren.

Der Aether wurde abdestillirt, der Rückstand mit gleichem Volum Wasser versetzt, schwefelsaure Magnesia zur Beförderung der Filtration zugefügt und filtrirt. Das Filtrat wurde mit Aether extrahirt, dieses Aetherextrakt mit Zinkoxyd oder  $Zn\ CO^3$  gekocht, heiss filtrirt, bis zum kleinen Volum eingengt und in den Exsiccator zur Crystallisation des milchsauren Zink gebracht. Da aber die schwefelsaure Magnesia die Filtration nur wenig beschleunigte, so wurde in den nächsten Versuchen ein anderes Verfahren eingeschlagen. Der Rückstand wurde mit Barytwasser behandelt, der überschüssige Baryt mit  $CO^2$  entfernt und abfiltrirt, das Filtrat bis zum kleinen Volum abgedampft und dann tropfenweise Zinksulfatlösung zugefügt und abfiltrirt. Das Filtrat wurde eingedampft und in den Exsiccator zur Crystallisation des milchsauren Zink gebracht.

Bei dieser Bearbeitung gelang es mir nur 1 Mal Spuren freier Milchsäure nachzuweisen und zwar in den ruhenden Muskeln.

Auf Grund dieser Erfahrungen möchte ich behaupten, dass die Milchsäure in den tetanisirten, wie in den ruhenden Muskeln an Basen gebunden ist.

Um die Milchsäure in Freiheit zu setzen, versetzte ich das Alkoholextract mit dem gleichen Volum Salzsäure (1 Th. conc. Salzsäure + 2 Th. Wasser) und daraus wurde die Milchsäure mit grossen Portionen Aether ausgeschüttelt.

Der Aetherauszug wurde bis auf ein kleines Volum eingedampft, mit gleichem Volum Wasser versetzt, mit Zinkoxyd oder kohlen saurem Kalk gekocht, heiss filtrirt, bis zum kleinen Volum auf dem Wasserbad eingeeengt und in den Exiccator zur Crystallisation des milchsauern Zink gebracht. Die Crystalle wurden mit einer Mischung von 1 Theil Aether und 2 Theilen Alkohol ausgewaschen, die Flüssigkeit auf ein Filter gebracht, dieses Filtrat auf dem Wasserbad eingedampft und auf milchsaurer Zink untersucht. Das Filter wurde mit heissem Wasser ausgewaschen und das Waschwasser in der Schale, wo die Crystalle von milchsaurer Zink sich befanden, gesammelt. Das milchsaurer Zink, auf solche Weise erhalten, wurde noch 1 oder 2 Mal umkrystallisirt, dann in diesem Salze der Gehalt an Crystallwasser und an Zink bestimmt oder daraus das Kalksalz gewonnen und Crystallwasser und Calciumgehalt bestimmt.

Die auf diesem Wege erhaltenen Resultate sind in folgender Tabelle zusammengestellt.

Im Wasserauszuge der Muskeln waren keine milchsaurer Salze vorhanden.

(Tabelle I folgt auf nächster Seite.)

Wie aus der Tabelle ersichtlich, ist die Milchsäuremenge in den tetanisirten Muskeln viel geringer, als in den ruhenden.

Um mehr Sicherheit darüber zu gewinnen, durchschnitt ich den zwei Kaninchen je einen Ischiadicus, so dass das betreffende Bein im Laufe von 46 Stunden gelähmt war.

(Tabelle II folgt auf nächster Seite.)

Also enthalten die paralyisirten Muskeln mehr Milchsäure, als die tetanisirten.

Das Alkoholextrakt erweist sich zugleich in den tetanisirten Muskeln bedeutend geringer, als in den ruhenden.

Nach Helmholtz<sup>1)</sup> und Ranke<sup>2)</sup> beträgt die Alkoholextraktmenge der tetanisirten Muskeln etwas mehr, als die der ruhenden. Diese Widersprüche erklären sich, glaube ich,

<sup>1)</sup> Müller's Archiv 1845, S. 72—83.

<sup>2)</sup> Tetanus, S. 131.

dadurch, dass die beiden Forscher ihre Bestimmungen bei Blutcirculationsausschluss machten, meine Untersuchungen sind dagegen bei fortdauernder Blutcirculation angestellt; hier werden jedenfalls die gebildeten Stoffwechselprodukte mit dem Blute entfernt.

Tabelle I.

Versuchs- Nummer.	Gewicht der Muskeln in gr.	Menge des milch- sauren Zink. (ohne Crystallwasser.)		Alkoholextrakt- menge.	
		gr.	auf 100 Th. des frischen Muskels.	absolute Menge in gr.	auf 100 Th. des frischen Muskels.
1. <sup>1)</sup>	Ruhend 134	a, 0,369	<b>0,275</b> %	3,475	<b>2,593</b> %
	Tetanisirt 139	a', 0,278	0,186 »	3,162	2,122 »
2. <sup>2)</sup>	Ruhend 189	b, 0,462	<b>0,244</b> »	5,270	<b>2,788</b> »
	Tetanisirt 207,5	b', 0,138	0,066 »	5,182	2,497 »
Milchsaurer Kalk.					
3. <sup>3)</sup>	Ruhend 213	c, 0,451	<b>0,211</b> »	6,065	<b>2,847</b> »
	Tetanisirt 237,5	c', 0,253	0,106 »	5,761	2,425 »
a,	Crystallwasser	13,6 %	— Zinkgehalt	28,5 %	
a',	»	13,1 »	»	30,1 »	
b,	»	13,1 »	»	22,3 »	
b',	»	13,0 »	»	23,6 »	
c,	Milchsaurer Kalk	23,6 »	— Kalkgehalt	18,5 »	
c',	»	30,8 »	»	16,1 »	

Tabelle II.

Gewicht der Muskeln in gr.	Milchsaures Zink (mit Crystallwasser.)			Alkoholextraktmenge.		
	gr.	auf 100 Th. des frischen Muskels.	auf 100 Th. der trockenen Substanz.	absolute Menge.	auf 100 Th. des frischen Muskels.	auf 100 Th. der trockenen Substanz.
Gelähmt. Musk. 121,5	0,594	<b>0,488</b> %	<b>2,043</b> %	3,553	<b>2,924</b>	<b>12,225</b> %
Normal. 50' lang tetanisirt. 127	0,482	0,379 »	1,837 »	3,180	2,503	12,120 »
	Crystallwasser 13	0,0 (?)	— Zinkgehalt	27,2 %		
	»	12,2 »	»	23,0 »		

<sup>1)</sup> Fleisch von 2 Kaninchen.

<sup>2)</sup> » 3 »

<sup>3)</sup> » 3 »

Wenn die Muskeln keine freie Milchsäure enthalten, dann möchte ich fragen: welche Säure Heidenhain und Ranke bestimmt haben, ersterer colorimetrisch, der Letztere durch Titrirung mit Natronlauge?

Dies ist aus Folgendem ersichtlich:

Weder die lebendigen, noch die schon totenstarren Muskeln von Kaninchen, Tauben, Fröschen zeigen, in absoluten Alkohol eingebracht, jemals saure Reaction, wie ich mehrere Male mich überzeugt habe. Aber wenn dieselben Muskeln aus dem Alkohol in Wasser gebracht werden, so nimmt dieses nach 2—6 Minuten deutlich saure Reaction an. Werden sie wieder in Alkohol gelegt, zeigt sich wieder in keinem Falle saure Reaction u. s. w.

Daraus kann man schliessen, dass die Substanz, welche saure Reaction bedingt, sich nicht in Alkohol auflöst, während sie sich leicht in Wasser, in Cl Na-Lösung von verschiedener Concentration, sogar in ganz gesättigter Cl Na-Lösung löst. Diese Substanz kann offenbar nicht Milchsäure sein. In Muskeln, welche in destillirtem Wasser erstarrt waren, konnte ich auch keine freie Milchsäure nachweisen. Die Substanz, welche die saure Reaction der Muskeln verursacht, ist saures phosphorsaures Kali, wie schon Liebig<sup>1)</sup>, Fremy und Valenciennes<sup>2)</sup> meinten. Von der vollkommenen Richtigkeit dieser Ansicht konnte ich mich überzeugen in der folgenden Weise: Muskelwasserauszug habe ich bis zur Trockene abgedampft, dann mit 50% Spiritus behandelt, abfiltrirt, das Filtrat bis zur Syrups Consistenz eingeeengt und zur Crystallisation stehen gelassen. Wäscht man die Crystalle mit starkem Alkohol und crystallisirt abermals um, so bekommt man Crystalle des sauren phosphorsauren Kali.

Heidenhain und Ranke bestimmten also die Säuerungsfähigkeit des vorhandenen sauren phosphorsauren Kali, und nicht der Milchsäure.

Wir haben, neben der Milchsäuremenge, auch die Säuregrade der Muskeln bestimmt. Dazu wurde die folgende Methode

<sup>1)</sup> Annalen d. Chemie u. Pharmacie, Bd. 61, S. 335.

<sup>2)</sup> Journal de Pharmacie et de chimie 1855, S. 402.

benutzt. Schon Du Bois-Reymond<sup>1)</sup> constatirte, dass «Froschmuskeln, die der Siedhitze ausgesetzt waren, nie sauer werden.» Solche Muskeln reagiren neutral oder alkalisch, aber die Flüssigkeit, wie ich mehrere Male gesehen habe, besitzt immer saure Reaction. Zum Beispiel: Ich habe die Muskeln der hinteren Extremitäten von 3 Fröschen, in kleinen Stückchen, in 200 CC. siedender  $\frac{1}{2}$  % ClNa-Lösung eingebracht, 5 Minuten gekocht, herausgenommen; dann noch ClNa-Lösung zugefügt, neue, ganz lebendige Fleischstückchen eingeworfen u. s. w., so dass ungefähr 500 CC. ClNa-Lösung verbraucht und 9—10 gr. der Muskeln gekocht wurden. Dabei bekam das Fleisch alkalische Reaction, die im Laufe von 4 Tagen, bis zum Beginn der Fäulniss anhielt; aber die bis 15 CC. eingedampfte Flüssigkeit hatte stark saure Reaction; zur vollkommenen Neutralisation derselben verbrauchte ich 4,6 CC.  $\frac{1}{10}$  Normalnatronlauge.

Auch die Muskeln, welche schon früher starr geworden sind und sauer reagiren, können beim Kochen ebenfalls der sauren Reaction beraubt werden. Es geht also saures phosphorsaures Kali beim Kochen des Fleisches in wässriger Flüssigkeit sehr rasch in das Wasser über, und ich habe diese Methode benutzt, um die Säuregrade der Muskeln zu bestimmen.

Die mit dem absoluten Alkohol ganz erschöpften Muskeln wurden in 5-faches Volum siedenden Wassers, in kleinen Portionen hineingeworfen, 5 Minuten gekocht, dann im Porcellanmörser zerrieben, noch 1 Mal in dasselbe Volum frischen siedenden Wassers eingebracht, wieder zerrieben u. s. w., bis 3 Male. Nur der erste Auszug hatte saure Reaction, der zweite war fast neutral, aber der dritte — immer neutral. Die gesammten Auszüge wurden abfiltrirt und bis auf solches Volum abgedampft, dass auf 1 gr. Fleisch 1,1—1,6 CC. der Flüssigkeit blieb, dann 50 CC. von dieser Flüssigkeit mit Natronlauge titirt und die Säuregrade auf Schwefelsäure berechnet.

In denselben 50 CC. wurde dann die Wasserextraktmenge bestimmt, die Flüssigkeit wurde auf dem Wasserbade bis zur

<sup>1)</sup> Monatsberichte, l. c., S. 304.

Trockene abgedampft, bei 100° C. getrocknet und dann gewogen. Bei der Berechnung wurde die Natronlauge abgezogen.

Tabelle III.

Versuchsnummer.	Gewicht der Muskeln in gr.		Wasserextraktmenge.		% Säuregrade auf Schwefelsäure berechnet.
			absolute Menge.	auf 100 Th. der frischen Muskeln.	
1.	Ruhender	134	3,142	2,344%	<b>0,234%</b>
	Tetanisirter	149	3,183	2,136 »	0,140 »
2.	Ruhender	189	4,945	2,616 »	<b>0,173 »</b>
	Tetanisirter	207,5	5,230	2,520 »	0,126 »
3.	Ruhender	213	4,594	2,156 »	<b>0,221 »</b>
	Tetanisirter	237,5	5,107	2,150 »	0,143 »
4.	Gelähmter	121,5	2,542	2,092 »	<b>0,243 »</b>
	Norm.tetanis.	127	2,746	2,160 »	0,198 »

Wie aus obigem ersichtlich, ist der Säuregrad der ruhenden und sogar der gelähmten Muskeln viel höher, als der der tetanisirten (Ranke.)

Die Wasserextractmenge der tetanisirten Muskeln ist meist etwas geringer, als die der ruhenden (Helmholtz, Ranke).

Die Resultate dieser Untersuchungen sind also folgende:

- 1) Weder die ruhenden, noch die arbeitenden Muskeln enthalten freie Milchsäure.
- 2) Die Quantität der milchsauren Salze ist in den arbeitenden Muskeln viel geringer, als in den ruhenden.
- 3) Die Alkoholextraktmenge der arbeitenden Muskeln, bei fortdauernder Blutcirculation, ist bedeutend geringer, als in den ruhenden.
- 4) Die saure Reaction der todtenstarrten Muskeln hängt von saurem phosphorsaurem Kali ab.
- 5) Die Menge dieses Salzes ist in arbeitenden Muskeln viel geringer, als in den ruhenden.

6) Bei der Gerinnung des Muskels, sei es durch Alkohol, oder durch Siedhitze, oder durch gesättigte ClNa-Lösung bedingt, erhält der Muskel stets die saure Reaction. Bei allen Erstarrungsarten tritt Ansäuerung der Muskeln ein.

In dem siedenden Wasser bildet sich das Maximum an Säure (beim Kaninchen im Durchschnitte nach Ranke<sup>1)</sup> 0,225%).

Was die saure Reaction der tetanisirten, aber noch nicht erstarrten Muskeln betrifft, so hängt diese, wie ich glaube, von CO<sup>2</sup> ab. Die Untersuchungen, welche ich im Laboratorium des Hrn. Prof. Kowalewsky (in Kasan) mit Salzfröschen ausgeführt habe, zeigen, dass das in einer mit Lakmus gefärbten 1/2% ClNa-Lösung arbeitende Froschbein diese etwas röthet, aber dass diese rothe Farbe beim Kochen und bei Durchleitung eines Luftstroms verschwindet.

Zum Schluss halte ich es für meine angenehme Pflicht, Hrn. Prof. Hoppe-Seyler und Hrn. Dr. Herter für ihre äusserst freundliche Unterstützung bei dieser Arbeit, meinen besten Dank auszusprechen.

Strassburg, den 7. August 1880.

<sup>1)</sup> Tetanus, S. 148.