

Über die quantitative Bestimmung der d-Milchsäure in den Körperflüssigkeiten und den Organen.

Von
J. Yoshikawa.

Mit zwei Kurvenzeichnungen im Text.

(Aus dem medizinisch-chemischen Institut der Universität Kyoto.)

(Der Redaktion zugegangen am 16. August 1913.)

Da d-Milchsäure einen wichtigen Bestandteil der Körperflüssigkeiten und der Organe bildet und da sie bei der Vergiftung mit den verschiedenen Giften und bei den krankhaften Vorgängen des menschlichen und tierischen Stoffwechsels in reichlicher Menge im Organismus entsteht, ist es wohl begreiflich, daß die Kliniker sowie die biologischen Chemiker seit geraumer Zeit der quantitativen Bestimmung der d-Milchsäure im Harn, sowie in den Körperflüssigkeiten und den Organen eine besondere Aufmerksamkeit zugewandt und sich viel Mühe gegeben haben, für diesen Zweck ein sicheres und leicht ausführbares Verfahren ausfindig zu machen.

Unter den zahlreichen Methoden sei hier nur derjenigen, welche auf exakter chemischer Grundlage aufgebaut sind und das Vertrauen der Fachmänner zu erwerben vermochten, Erwähnung getan.

R. Böhm¹⁾ wendete zur Bestimmung der Milchsäure in Muskeln folgendes Verfahren an. Die eingedickten, mit Barytwasser neutralisierten Muskeldecocte wurden mit Alkohol unter Erwärmen gefällt, die gefällte schmierige Masse in heißem Wasser gelöst und wieder mit Alkohol gefällt. Ein dünner Sirup, welcher nach dem Abdestillieren des Alkohols von den Alkoholauszügen zurückgeblieben war, wurde zuerst durch Aus-

¹⁾ R. Böhm, Pflügers Archiv, Bd. 23, S. 57—58.

schütteln mit Äther entfettet und dann nach starkem Ansäuern mit verdünnter Schwefelsäure ausgeäthert. Von den Ätherauszügen wurde der Äther abdestilliert, der Rückstand zur Ausfällung der mitgenommenen Schwefelsäure mit Baryumcarbonat behandelt, filtriert und mit heißem Wasser aufgenommen. Das Filtrat und die Waschwässer, welche milchsaures Baryum enthielten, wurden vereinigt, unter gelindem Kochen durch vorsichtigen Zusatz von einer Zinksulfatlösung genau gefällt, filtriert und gut mit heißem Wasser ausgewaschen. Man dampfte nun die Filtrate in einer gewogenen Glasschale auf dem Wasserbade bis zur beginnenden Krystallisation ein und ließ in einem Exsikkator bis zur Gewichtskonstanz stehen.

Torasaburo Araki¹⁾ unterwarf dieses Verfahren einer genauen Prüfung und fand, daß das aus Muskeln nach diesem Verfahren dargestellte Zinklactat stets chlorhaltig war. Eine Erklärung dieses auffälligen Befundes glaubte er darin suchen zu können, daß das im Muskelextrakt vorhandene Chlorkalium durch Zusatz von Schwefelsäure zerlegt wird und dabei gebildete Salzsäure beim Schütteln mit Äther in den letzteren übergeht. Um diesen Fehler zu beseitigen, ist folgende Methode²⁾ von ihm angegeben:

Der Verdampfungsrückstand der Alkoholauszüge wurde nach dem Verdunsten des Alkohols mit Äther geschüttelt, um Fette zu beseitigen, darauf der rückständige Sirup nach Werther resp. dem Drechselschen Verfahren mit Phosphorsäure stark angesäuert und 5 mal mit stets erneuerten Äthermengen ausgeschüttelt. Aus diesen ätherischen Auszügen erhielt man nach Abdestillieren des Äthers, Kochen mit Zinkcarbonat, Filtrieren und Eindampfen das Zinklactat, welches an der Luft über Chlorcalcium oder über konzentrierter Schwefelsäure zur Gewichtskonstanz stehen blieb.

Für die Isolierung der Milchsäure aus dem Harn hat Torasaburo Araki³⁾ das obige Verfahren in folgender Weise modifiziert:

¹⁾ Torasaburo Araki, Diese Zeitschrift, Bd. 15, S. 336.

²⁾ Torasaburo Araki, a. a. O.

³⁾ Torasaburo Araki, Diese Zeitschrift, Bd. 19, S. 429.

Der nach Abdestillieren des Äthers zurückbleibende Sirup, welcher hauptsächlich aus Milchsäure bestand, wurde in ein wenig Wasser gelöst, eventuell filtriert, mit reinem Bleicarbonat ca. 30 Minuten auf dem Wasserbade erhitzt, nach dem Erkalten filtriert. Nachdem das Blei aus dem Filtrat durch Schwefelwasserstoff entfernt und die bleifreie Flüssigkeit stark eingeeengt war, wurde die letztere mit Äther erschöpft, und der Destillationsrückstand der Ätherauszüge zur Darstellung des Zinklaktates verwendet.

Nach dem gleichen Prinzip arbeiteten K. Katsuyama und S. Saito, sie hielten es für notwendig, daß die aus dem Blute gewonnene Milchsäure erst über Baryumsalz gereinigt und dann in Zinkverbindung übergeführt wird.

A. Heffter bediente sich bei Darstellung der Milchsäure aus Muskeln einer Alkoholmethode, die in folgendem bestand: Die zerkleinerte Muskelmasse wurde mit der 5fachen Menge Alkohol durchgerührt, nach längerem Stehen abfiltriert, die Muskelmasse bei gelinder Wärme getrocknet und in der Reibschale fein zerrieben. Der Destillationsrückstand des Alkohol-extrakts wurde samt dem Muskelpulver in Soxhletschen Extraktionsapparaten mit 96%igem Alkohol 24 Stunden extrahiert, die alkoholische Lösung eingedampft, der Rückstand nach der Neutralisation mit Natriumcarbonat 3 mal mit Äther geschüttelt, um das Fett zu entfernen. Man säuerte nun die vom Fett befreite Flüssigkeit stark mit Phosphorsäure an und schüttelte 6 mal mit dem 10fachen Volumen Äther. Aus dem Destillationsrückstand der Ätherauszüge wurde durch Kochen desselben mit Zinkcarbonat und Wasser das Zinklactat gewonnen.

W. M. Fletcher und F. Gowland Hopkins¹⁾ wendeten zur Bestimmung der Milchsäure im Froschmuskel folgendes Verfahren an. Von den abgeschnittenen hinteren Beinen der Frösche wurden die Muskeln unter starker Abkühlung abpräpariert und in eiskaltem Alkohol zerrieben. Der Verdampfungsrückstand der alkoholischen Auszüge wurde mit Wasser aufgenommen, mit Tierkohle gekocht, filtriert, gut ausgewaschen

¹⁾ W. M. Fletcher u. F. Gowland Hopkins, Journ. of Physiol., Bd. 35, S. 250.

und zur Trockne eingedampft. Der Rücksand wurde in wenig Wasser gelöst und nach dem Ansäuern mit Phosphorsäure ausgeäthert. Aus dem Ätherrückstand wurde das Zinklactat auf die übliche Weise dargestellt.

Endlich kommt noch die Methode von Gustav Embden und Friedrich Kraus in Betracht, die für die Bestimmung der Milchsäure im Blut und Leber ausgearbeitet wurde. Die Flüssigkeit, die nach Schenk mit Salzsäure und Sublimat enteiweißt war, wurde von überschüssigem Quecksilber mit Schwefelwasserstoff befreit, das Filtrat im Vakuum bei einer 50° nicht übersteigenden Temperatur des Heizwassers stark eingeengt und nach Ansäuern mit Phosphorsäure und Sättigung mit Ammonsulfat mit Äther extrahiert. Die Milchsäure, die im Ätherextrakt enthalten war, wurde über das Bleisalz gereinigt und in das Zinksalz übergeführt.

Es kann nach den erwähnten Methoden die Milchsäure in den Körperflüssigkeiten und den Organen bestimmt werden, vorausgesetzt, daß die Milchsäure vollständig durch Schütteln mit Äther extrahiert und von anderen gleichzeitig extrahierten Säuren getrennt wird; allein es stellt sich heraus, daß das nach den angeführten Methoden dargestellte Zinklactat manchmal so stark verunreinigt ist, daß man es überhaupt nicht zur vollkommenen Krystallisation bringen kann, wie Gustav Embden und Friedrich Kraus angeben und ich mich durch eigens darauf gerichtete Versuche überzeugen konnte. Außerdem kommt noch der Umstand in Betracht, daß bei Gegenwart von dl- und d-Milchsäure die beiden mitbestimmt werden. Eine Berechnung der d-Milchsäure aus der gewogenen Menge des Zinklactats kann in diesem Fall daher nur ein unsicheres Resultat liefern, auch dann, wenn das Zinklactat durch mehrmalige Umkrystallisation gereinigt wird.

Um den Fehler der gravimetrischen Methoden möglichst zu beseitigen, arbeiteten O. v. Fürth und D. Charnass¹⁾ ein Verfahren aus, welches in seinen Grundzügen darauf beruht, daß die Milchsäure in einer mit Schwefelsäure angesäuerten Lösung durch Kaliumpermanganat zu Aldehyd oxydiert wird und daß

¹⁾ O. v. Fürth u. D. Charnass, Biochem. Zeitschr., Bd. 26, S. 199.

der aus der Milchsäure entstandene Acetaldehyd nach der Vorschrift von Ripper auf titrimetrischem Wege bestimmt wird. Diesem Verfahren soll, nach Angabe der Verfasser, ein Fehler von 10% anhaften, der wohl durch Überoxydation des Aldehydes bedingt sein dürfte.

Dieses Verfahren, das ja da, wo nur eine Art von den Milchsäuren zur Bestimmung kam, sich als recht brauchbar erwies, gestattet leider keinen sicheren Schluß auf die Menge der in einem Gemisch von den Milchsäuren vorhandenen d-Milchsäure.

In Ermangelung einer zuverlässigen Methode für die quantitative Bestimmung der d-Milchsäure habe ich vor allem mein Augenmerk auf das Lithiumsalz der d-Milchsäure gerichtet, dessen Rotationseinwirkung auf polarisiertes Licht nach der grundlegenden Untersuchung von Felix Hoppe-Seyler und Torasaburo Araki¹⁾ im innigsten Zusammenhang mit der Konzentration seiner Lösung steht, so daß ein Verfahren der d-Milchsäurebestimmung wohl auf dieser Eigenschaft zu begründen ist. Es ergab sich nunmehr die Aufgabe, die Abhängigkeit des Drehungsvermögens des Lithiumlactates von der Konzentration seiner Lösung zahlenmäßig anzugeben und daraus eine brauchbare Formel abzuleiten.

I. Die Abhängigkeit der Rotationswerte des Lithiumlactates von den Konzentrationsgraden seiner Lösungen.

Die Darstellung des d-Lithiumlactates ging stets vom d-Zinklactat aus, das aus Fleischextrakt gewonnen wurde und sich als völlig rein erwies. Zur Überführung des Zinklactates in die Lithiumverbindung wurde die Lösung des ersteren mit Schwefelwasserstoff behandelt, die vom Schwefelzink abfiltrierte Flüssigkeit unter vermindertem Druck bei einer 50° des Wasserbades nicht übersteigenden Temperatur eingeengt und im Sutoschen Extraktionsapparat mit Äther extrahiert. Nach dem Abdestillieren des Äthers wurde der Rückstand mit Wasser

¹⁾ E. Hoppe-Seyler und T. Araki, Diese Zeitschr., Bd. 20, S. 365.

verdünnt, mit reinem Lithiumcarbonat bis zu schwach saurer Reaktion versetzt und auf dem Wasserbade bis zu beginnender Krystallisation eingedampft. Die abgeschiedenen Krystalle wurden zur Entfernung der anhaftenden freien Milchsäure zunächst gründlich mit absolutem Alkohol, dann mit Äther ausgewaschen und über Paraffin und konzentrierter Schwefelsäure im Exsikator bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

0,2087 g Lithiumsalz gaben 0,1190 g Lithiumsulfat = 7,19% Li.

0,1407 „ „ „ 0,0810 „ „ = 7,25% „

Berechnet für $C_3H_5O_3Li$: Gefunden:

7,23% Li.

7,19% Li.

7,25% „

Für meine Untersuchungen fand ein Landoltscher Polarisationsapparat mit dreiteiligem Gesichtsfeld aus der Werkstätte von Fr. Schmidt und Haensch Anwendung. Die Drehungswerte der Lösungen des d-Lithiumlactates in den verschiedenen Konzentrationsgraden wurden stets bei 20° und Natriumlicht bestimmt und auf 2 dm-Rohrlänge reduziert.

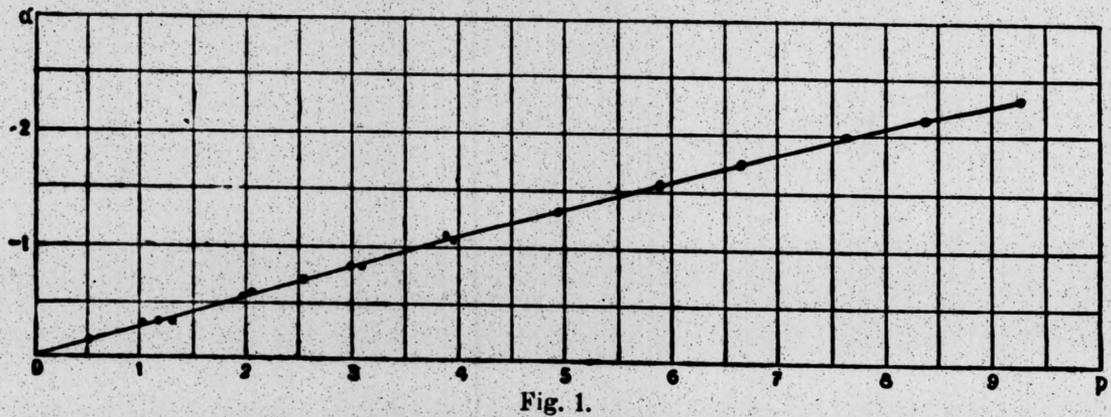
Tabelle 1.

p	d	c	α	p	d	c	α
0,506	1,0022	0,507	-0,15	3,882	1,0164	3,946	-1,05
1,026	1,0041	1,030	-0,29	3,910	1,0168	3,976	-1,06
1,155	1,0048	1,161	-0,33	4,900	1,0205	5,001	-1,32
1,288	1,0055	1,295	-0,37	5,856	1,0245	5,999	-1,57
1,987	1,0085	2,004	-0,57	6,637	1,0284	6,825	-1,76
2,058	1,0088	2,076	-0,59	7,587	1,0322	7,831	-2,00
2,500	1,0104	2,526	-0,71	8,360	1,0354	8,656	-2,18
2,969	1,0125	3,006	-0,83	9,224	1,0391	9,585	-2,37
3,018	1,0127	3,056	-0,83				

p = die Gewichtsprocente des d-Lithiumlactates; d = die Dichte der Lösungen; $c = p \times d$; α = der beobachtete Drehungswinkel.

Die Abhängigkeit von p, der Anzahl Gramme des d-Lithiumlactates in 100 g Lösung, und α , dem für Natriumlicht

und 2 dm-Rohrlänge gefundenen Werte, ist auf Fig. 1 graphisch dargestellt worden. Auf der Abszisse ist p , auf der Ordinate α angegeben.



Aus der obigen Kurve läßt sich folgende Formel ableiten :

$$\alpha = -0,286 p + 0,00342 p^2 \dots\dots\dots A.$$

Vergleicht man nun die nach der Formel A. berechneten Werte mit den direkt von mir gemessenen, so findet man eine befriedigende Übereinstimmung zwischen den beiden Werten:

Tabelle 2.

p	α für 2 dm Rohrlänge		p	α für 2 dm Rohrlänge	
	Die durch Messungen erhaltenen Werte	Die nach der Formel A berechneten Werte		Die durch Messungen erhaltenen Werte	Die nach der Formel A berechneten Werte
0,506	-0,15	-0,144	4,000	-	-1,09
1,000	-	-0,28	4,900	-1,32	-1,32
1,026	-0,29	-0,289	5,000	-	-1,35
1,155	-0,33	-0,327	5,856	-1,57	-1,56
1,288	-0,37	-0,362	6,000	-	-1,59
1,987	-0,57	-0,555	6,637	-1,76	-1,78
2,000	-	-0,56	7,000	-	-1,83
2,085	-0,59	-0,575	7,587	-2,00	-1,97
2,500	-0,71	-0,694	8,000	-	-2,07
2,969	-0,83	-0,818	8,360	-2,18	-2,15
3,000	-	-0,83	9,000	-	-2,29
3,018	-0,83	-0,832	9,224	-2,37	-2,35
3,882	-1,05	-1,058	10,000	-	-2,52
3,910	-1,06	-1,07			

Ist also der Wert α festgestellt, so läßt sich der Wert p leicht nach der folgenden Formel berechnen:

$$p = \frac{0,286 - \sqrt{0,081796 + 0,01368 \alpha}}{0,00684} \dots\dots\dots B.$$

Die Abhängigkeit von c , der Anzahl Gramme des Lithiumlactates in 100 ccm Lösung, und α , dem für Natriumlicht und 2 dm-Rohrlänge gefundenen Drehungswinkel, wird durch Fig. 2 wiedergegeben, die einer weiteren Erläuterung nicht bedarf.

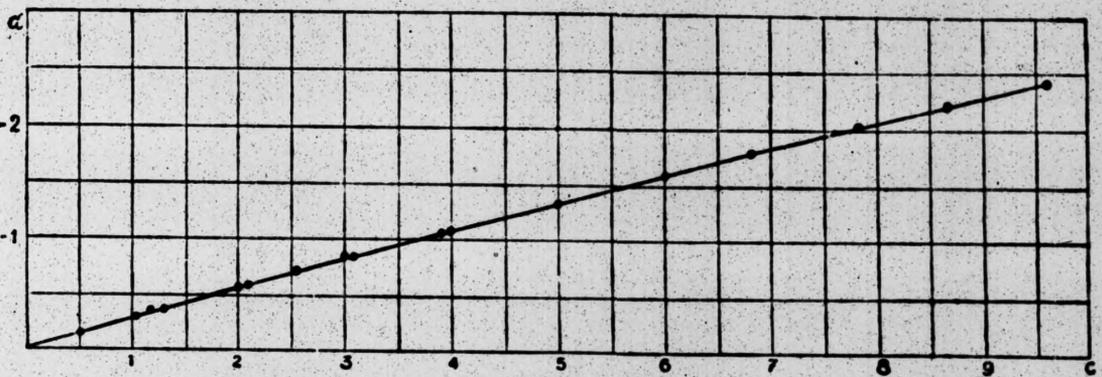


Fig. 2.

Aus der Betrachtung der Kurve findet man mithin für die Berechnung des α folgende Formel:

$$\alpha = -0,2864 c + 0,00405 c^2 \dots\dots\dots C.$$

Wie aus umstehender Tabelle zu ersehen ist, stimmen die nach der Formel C. berechneten Werte α mit den durch die Messungen erhaltenen recht gut überein:

Ist α für eine Lösung von d-Lithiumlactat bekannt, so ergibt sich c der betreffenden Lösung ohne weiteres aus folgender Formel:

$$c = \frac{0,2864 - \sqrt{0,082025 + 0,0162 \alpha}}{0,0081} \dots\dots\dots D.$$

II. Bestimmung der d-Milchsäure in der wässerigen Lösung nach dem polarimetrischen Verfahren.

Um die Frage zu entscheiden, ob die d-Milchsäure in der wässerigen Lösung sich nach dem oben geschilderten Verfahren bestimmen läßt, verfuhr ich zunächst wie folgt: Man löste eine bestimmte Menge von reinem d-milchsaurem Zink

Tabelle 3.

c	α für 2 dm Rohrlänge		c	α für 2 dm Rohrlänge	
	Die durch Messungen erhaltenen Werte	Die nach der Formel C berechneten Werte		Die durch Messungen erhaltenen Werte	Die nach der Formel C berechneten Werte
0,507	— 0,15	— 0,144	4,000	—	— 1,08
1,000	—	— 0,282	5,000	—	— 1,33
1,030	— 0,29	— 0,291	5,001	— 1,32	— 1,331
1,161	— 0,33	— 0,327	5,999	— 1,57	— 1,572
1,295	— 0,37	— 0,364	6,000	—	— 1,57
2,000	—	— 0,557	6,825	— 1,76	— 1,766
2,004	— 0,57	— 0,558	7,000	—	— 1,81
2,076	— 0,59	— 0,577	7,831	— 2,00	— 1,995
2,526	— 0,71	— 0,698	8,000	—	— 2,03
3,000	—	— 0,823	8,656	— 2,18	— 2,176
3,006	— 0,83	— 0,824	9,000	—	— 2,25
3,056	— 0,83	— 0,837	9,585	— 2,37	— 2,373
3,946	— 1,05	— 1,067	10,000	—	— 2,46
3,976	— 1,06	— 1,075			

in Wasser auf, erwärmte auf dem Wasserbade, setzte heiß gesättigte Lithiumcarbonatlösung nach und nach im Überschuß zu, erwärmte nach vollständiger Ausfällung noch 30 Minuten, filtrierte dann von gebildetem basischen Zinkcarbonat und wusch es mit kochendem Wasser aus. Das Filtrat und die Waschwässer wurden vereinigt, auf dem Wasserbade bis auf ein kleines Volumen eingedampft, in einen Meßkolben gebracht und mit dem Waschwasser der zum Eindampfen der Lithiumlactatlösung benutzten Schale bis zur Marke gefüllt. Man ließ nun 24 Stunden stehen, filtrierte durch ein trockenes Filter in ein trockenes Gefäß und polarisierte.

Versuch 1.

0,8557 g wasserfreies d-Zinklactat, entsprechend 0,6330 g d-Milchsäure, wurden in der oben erwähnten Weise in Lithiumsalz umgewandelt, mit Wasser auf 50 ccm aufgefüllt und polarisiert.

$l = 2 \text{ dm}$; $\alpha = -0,373^\circ$; aus α nach Formel D berechnet, beträgt c 1,333.

Hieraus ergab sich:

$$\frac{1,333 \times 50}{100} = 0,6665 \text{ g Lithiumlactat} = 0,6253 \text{ g d-Milchsäure.}$$

Es wurden sonach 98,79% der in der Lösung enthaltenen d-Milchsäure gefunden.

Versuch 2.

0,7343 g wasserfreies d-Zinklactat, entsprechend 0,5432 g d-Milchsäure, wurden in Lithiumlactat umgewandelt, mit Wasser auf 25 ccm aufgetüllt und polarisiert.

$l = 2 \text{ dm}$; $\alpha = -0,64^\circ$; nach Formel D läßt aus α sich der Wert 2,309 für c berechnen.

Hieraus ergab sich:

$$\frac{2,309 \times 25}{100} = 0,5772 \text{ g Lithiumlactat} = 0,5415 \text{ d-Milchsäure.}$$

Es wurden sonach 99,72% der in der Lösung enthaltenen d-Milchsäure gefunden.

Versuch 3.

1,015 g wasserfreies d-Zinklactat, entsprechend 0,7509 g d-Milchsäure, wurden in Lithiumsalz umgewandelt, mit Wasser auf 25 ccm aufgefüllt und polarisiert.

$l = 2 \text{ dm}$; $\alpha = -0,87^\circ$; c , aus α nach Formel D berechnet = 3,179,

Hieraus ergab sich.

$$\frac{3,179 \times 25}{100} = 0,7948 \text{ g d-Lithiumlactat} = 0,7457 \text{ g d-Milchsäure.}$$

Es wurden sonach 99,31% der in der Lösung enthaltenen d-Milchsäure gefunden.

Versuch 4.

0,3888 g wasserfreies d-Zinklactat, entsprechend 0,2876 g d-Milchsäure, wurden in Lithiumsalz umgesetzt, mit Wasser auf 25 ccm aufgefüllt und polarisiert.

$l = 2 \text{ dm}$; $\alpha = -0,34^{\circ}$; c , aus α nach Formel D berechnet $= 1,21$.

Hieraus ergab sich:

$$\frac{1,21 \times 25}{100} = 0,302 \text{ g d-Lithiumlactat} = 0,2833 \text{ g d-Milchsäure.}$$

Es wurden sonach 98,51% der in der Lösung enthaltenen d-Milchsäure gefunden.

Versuch 5.

0,6186 g wasserfreies d-Zinklactat, entsprechend 0,4576 g d-Milchsäure, wurden in Lithiumsalz umgesetzt, mit Wasser auf 25 ccm aufgefüllt und polarisiert.

$l = 2 \text{ dm}$; $\alpha = -0,54^{\circ}$; c , aus α nach Formel D berechnet $= 1,938$.

Hieraus ergab sich:

$$\frac{1,938 \times 25}{100} = 0,4845 \text{ g d-Lithiumlactat} = 0,4546 \text{ g d-Milchsäure.}$$

Es wurden sonach 99,34% der in der Lösung enthaltenen d-Milchsäure gefunden.

Einige Versuche hatte ich auf folgende Weise ausgeführt: Eine bestimmte Menge von reinem d-milchsauren Zink wurde in Wasser gelöst, mit Phosphorsäure angesäuert und 72 Stunden lang im Extraktionsapparat mit Äther extrahiert. Der Destillationsrückstand des Ätherauszugs wurde in Wasser gelöst, mit Lithiumcarbonat neutralisiert, mit Wasser auf ein bestimmtes Volumen (25 ccm) aufgefüllt und polarisiert.

Versuch 6.

0,4924 g d-milchsaures Zink, entsprechend 0,3643 g d-Milchsäure, wurden nach dem obigen Verfahren in Lithiumsalz übergeführt und polarisiert.

$l = 2 \text{ dm}$; $\alpha = 0,43^{\circ}$; $c = 1,5345$.

Mithin:

$$\frac{1,5343 \times 25}{100} = 0,3836 \text{ g Lithiumlactat} = 0,35,99 \text{ g d-Milchsäure.}$$

Die Ausbeute betrug sonach 98,79%.

Versuch 7.

0,5207 g d-milchsaures Zink, entsprechend 0,3852 g d-Milchsäure, wurden auf gleiche Weise behandelt wie bei Versuch 6.

$$l = 2 \text{ dm}; \alpha = 0,46^{\circ}; c = 1,6444.$$

Mithin:

$$\frac{1,6444 \times 25}{100} = 0,4111 \text{ g Lithiumlactat} = 0,3857 \text{ g d-Milchsäure,}$$

Die Ausbeute betrug sonach 100,13%.

Versuch 8.

0,4883 g d-milchsaures Zink, entsprechend 0,3612 g d-Milchsäure, wurden auf gleiche Weise behandelt wie bei Versuch 6.

$$l = 2 \text{ dm}; \alpha = -0,43^{\circ}; c = 1,5345.$$

Mithin:

$$\frac{1,5345 \times 25}{100} = 0,3836 \text{ g Lithiumlactat} = 0,3599 \text{ g d-Milchsäure.}$$

Die Ausbeute betrug sonach 99,64%.

Aus den mitgeteilten Versuchsreihen kann man ohne weiteres folgern, daß die von mir ausgearbeitete Methode bei der Bestimmung der d-Milchsäure in der wässerigen Lösung so leistungsfähig ist, daß die damit erzielten Werte den Mengen der vorgelegten d-Milchsäure fast gleich kommen.

III. Bestimmung der d-Milchsäure bei Gegenwart von dl-Milchsäure nach dem polarimetrischen Verfahren.

Zur Erledigung der Frage, ob das polarimetrische Verfahren zur Bestimmung der d-Milchsäure auch bei Gegenwart von dl-Milchsäure ebenso gute Resultate gibt, waren die folgenden Versuche angestellt.

Versuch 1.

0,5020 g d-milchsaures Zink, entsprechend 0,3714 g d-Milchsäure, + 0,5390 g dl-milchsaures Zink wurden in Wasser gelöst, stark mit Phosphorsäure angesäuert und

72 Stunden im Extraktionsapparat mit Äther extrahiert. Die in den Äther übergegangenen Milchsäuren wurden nach dem Abdestillieren des Äthers in Lithiumsalze übergeführt, die Lösung mit Wasser auf 25 ccm aufgefüllt und polarisiert.

$$l = 2 \text{ dm}; \alpha = -0,44^\circ; c = 1,5679.$$

Mithin:

$$\frac{1,5679 \times 25}{100} = 0,3920 \text{ g Lithiumlactat} = 0,3678 \text{ g d-Milchsäure.}$$

Es wurden sonach 99,03% der zugesetzten d-Milchsäure gefunden.

Versuch 2.

0,3280 g d-milchsaures Zink, entsprechend 0,2427 g d-Milchsäure, + 0,3040 g dl-milchsaures Zink wurden in gleicher Weise wie bei Versuch 1 behandelt. Das Volumen der Lithiumlactatlösung betrug 25 ccm.

$$l = 2 \text{ dm}; \alpha = -0,29^\circ; c = 1,5679.$$

Mithin:

$$\frac{1,030 \times 25}{100} = 0,2575 \text{ g d-milchsaures Lithium} = 0,2416 \text{ g d-Milchsäure.}$$

Es wurden sonach 99,55% der zugesetzten d-Milchsäure gefunden.

Die angeführten Versuche zeigen übereinstimmend, daß dl-Milchsäure keinen Einfluß auf die Bestimmung der d-Milchsäure nach dem polarimetrischen Verfahren ausübt. Will man die Bestimmung der d- und dl-Milchsäure in einer wässrigen Lösung, die ein Gemenge dieser beiden Substanzen enthält, ausführen, so verfährt man wie folgt: Die beiden Milchsäuren werden in Lithiumsalze übergeführt. Man ermittelt zuerst die Menge der d-Milchsäure auf dem polarimetrischen Wege und bestimmt dann die Summe der d- und dl-Milchsäure nach der Methode von v. Fürth und Charnass; aus der Differenz ergibt sich die Quantität der dl-Milchsäure.

IV. Bestimmung der d-Milchsäure bei Gegenwart von flüchtigen Fettsäuren nach dem polarimetrischen Verfahren.

Daß beim Zusatz von essigsaurem Natron das Drehungsvermögen des Kaliumnatriumtartrats eine Abnahme erfährt, ist durch Long¹⁾ festgestellt. Es ist deshalb von Interesse, folgende Fragestellung in Angriff zu nehmen: ob nicht das Lithiumacetat irgend einen Einfluß auf das Drehungsvermögen des d-milchsauren Lithiums ausübe? ob das polarimetrische Verfahren sich auch für die Bestimmung der d-Milchsäure bei Gegenwart von Essigsäure anwendbar erweisen würde?

Versuch 1.

0,5230 g d-milchsaures Zink, entsprechend 0,3869 g d-Milchsäure, + 1 g essigsaures Natron wurden in Wasser gelöst und nach starkem Ansäuern mit Phosphorsäure 72 Stunden lang im Extraktionsapparat mit Äther extrahiert. Der Destillationsrückstand des Ätherextrates wurde in Wasser gelöst und mit Lithiumcarbonat neutralisiert, die Lösung der Lithiumsalze wurde mit Wasser auf 25 ccm aufgefüllt und polarisiert.

$$l = 2 \text{ dm}; \alpha = -0,46^\circ; c = 1,6444.$$

Hieraus ergab sich:

$$\frac{1,6444 \times 25}{100} = 0,4111 \text{ g Lithiumlactat} = 0,3857 \text{ g d-Milchsäure.}$$

Mithin:

$$\text{d-Milchsäure in Gemenge} = 0,3869 \text{ g}$$

$$\text{Gefundene d-Milchsäure} = 0,3857 \text{ g}$$

$$\text{absoluter Fehler} = 0,0012 \text{ g.}$$

$$\text{Fehler } 0,31\%.$$

Versuch 2.

0,7670 g d-milchsaures Zink, entsprechend 0,5674 g d-Milchsäure, + 0,5 g essigsaures Natron wurden auf die gleiche Weise wie in Versuch 1 behandelt.

¹⁾ Long, zitiert nach Landolt: Das optische Drehungsvermögen, 2. Auflage, 1898, S. 216—217.

$$l = 2 \text{ dm}; \alpha = -0,66^\circ; c = 2,3827.$$

Hieraus ergab sich:

$$\frac{2,3827 \times 25}{100} = 0,5957 \text{ g Lithiumlactat} = 0,5589 \text{ g d-Milchsäure.}$$

Mithin:

$$\text{d-Milchsäure in Gemenge} = 0,5674 \text{ g}$$

$$\text{Gefundene d-Milchsäure} = 0,5589 \text{ g}$$

$$\text{absoluter Fehler} = 0,0085 \text{ g.}$$

$$\text{Fehler } 1,50\%.$$

Die Bestimmung der d-Milchsäure bei Gegenwart von Essigsäure ließ sich also nach dem polarimetrischen Verfahren in sehr befriedigender Weise durchführen, indem von der zugesetzten Milchsäure 98,5—99,69% wiedergefunden wurde. Es ist somit erwiesen, daß das Drehungsvermögen des d-milchsauren Lithiums keineswegs durch das essigsaure Lithium beeinflusst wird.

V. Bestimmung der d-Milchsäure im Harn nach dem polarimetrischen Verfahren.

Die Frage nach dem Vorkommen der Milchsäure im Harne ist schon vielfach Gegenstand experimenteller Untersuchungen gewesen. Von einigen Autoren gänzlich geleugnet, ist das Auftreten von Milchsäure im Harne bei gesunden Menschen von andern behauptet worden. E. Heuss¹⁾ spricht sich in seiner Arbeit über das Vorkommen von Milchsäure im menschlichen Harne auf das entschiedenste dagegen aus, daß die Milchsäure zu den normalen Harnbestandteilen gezählt werden dürfte; denn es gelang ihm nicht, eine Spur von Milchsäure selbst in etwa 50 l normalen Harns von ruhendem Menschen mit Sicherheit nachzuweisen. Abgesehen von den alten Angaben von Lehmann, Langendorff und Momms kam Ernst Jerusalem,²⁾ der sich mit einem titrimetrischen Verfahren zur quantitativen Bestimmung der Milchsäure in

¹⁾ E. Heuss, Archiv f. experim. Pathol. u. Pharmakol., Bd. 26, S. 142.

²⁾ Ernst Jerusalem, Biochem. Zeitschr., Bd. 12, S. 386.

Organen und tierischen Flüssigkeiten beschäftigt, gerade zu dem entgegengesetzten Resultate; er fand nämlich «in einer sehr kleinen Zahl von Fällen minimale Milchsäuremengen» im Harne von Gesunden und äußerte sich darüber wie folgt: «Wir glauben diesen Befund nicht auf irgend eine unter besonderen Umständen im Harne mancher Personen auftretende unbekannte Substanz zurückführen zu müssen, sondern auf den Umstand, daß eben kleine Milchsäuremengen, die mit den bisher üblichen Methoden einfach nicht nachweisbar waren, auch im normalen Harn auftreten dürfen.» Diese Angabe hat eine Bestätigung durch die Beobachtung von Hiromu Ishihara¹⁾ erfahren, der zufolge in normalem Menschenharn im Mittel 0,08 g Milchsäure im Liter enthalten sind.

Bei dieser Sachlage konnte ich nicht umhin, unter Anwendung vom polarimetrischen Verfahren den normalen Menschenharn auf d-Milchsäure zu untersuchen.

Versuch 1.

1000 ccm Harn von einem gesunden Menschen wurden auf dem Wasserbade bis zum Sirup eingedampft und mit Alkohol erschöpft. Der Destillationsrückstand der Alkoholauszüge wurde in wenig Wasser aufgenommen, mit Phosphorsäure angesäuert und 72 Stunden lang in einem Extraktionsapparat mit Äther extrahiert. Man löste den Destillationsrückstand des Ätherextraktes in Wasser auf, erwärmte mit Tierkohle und Lithiumcarbonat im Überschuß, filtrierte ab und wusch gründlich mit heißem Wasser aus. Das Filtrat und die Waschwässer wurden auf dem Wasserbade stark eingeeengt, in einen 25 ccm-Kolben gebracht, mit Wasser bis zur Marke aufgefüllt, nach 24 stündigem Stehenlassen durch trockenes Filter in ein trockenes Gefäß filtrierte und in einem 2 dm langen Rohr polarisiert.

Es erwies sich die Lösung als völlig inaktiv.

Versuch 2.

1000 ccm Harn von einem Gesunden bei gemischter Kost wurden auf die gleiche Weise wie bei Versuch 1 behandelt.

¹⁾ Hiromu Ishihara, Biochem. Zeitschr., Bd. 50, S. 482.

Es war im Ätherextrakt keine Spur von d-Milchsäure nachzuweisen.

Versuch 3.

1000 ccm Harn von einem Gesunden bei gemischter Kost wurden auf die gleiche Weise wie bei Versuch 1 behandelt. Hier konnte auch nicht das Vorhandensein von d-Milchsäure festgestellt werden.

Es sei hier gleich hervorgehoben, daß ich mehrmals größere Harnmengen von Gesunden bei verschiedener Kost stets mit negativem Resultate auf die d-Milchsäure untersucht habe.

Aus den mitgeteilten Versuchen geht mit großer Wahrscheinlichkeit hervor, daß der normale Menschenharn d-Milchsäure nicht in nachweisbarer Menge¹⁾ enthält. Man könnte nunmehr daran gehen, das Problem zu lösen, ob das polarimetrische Verfahren auch auf die Ermittlung der d-Milchsäure im Harne anwendbar ist.

Versuch 4.

0,0635 g d-Milchsäure, aus Zinklactat dargestellt und in Natriumsalz übergeführt, wurden 1000 ccm Harn von einem Gesunden zugesetzt, auf dem Wasserbade zum Sirup abgedampft und mit Alkohol erschöpft. Die Destillation der Alkoholauszüge erfolgte unter dem verminderten Druck bei einer 50° nicht übersteigenden Temperatur des Wasserbades und der Destillationsrückstand wurde nach dem Ansäuern mit 25 ccm konzentrierter Phosphorsäure, unter Zusatz von Tierkohle, 72 Stunden lang im Extraktionsapparat mit Äther extrahiert. Der Destillationsrückstand des Ätherextraktes wurde in wenig Wasser gelöst, mit Bleicarbonat im Überschuß und Tierkohle versetzt, eine Stunde auf dem Wasserbade erhitzt, nach völligem Erkalten filtriert und gründlich mit kaltem Wasser ausgewaschen. Das Filtrat und die Waschwässer wurden vereinigt, mit Schwefelwasserstoff behandelt, vom Schwefelblei unter Nachwaschen mit Wasser

¹⁾ Sollte d-Milchsäure als normaler Harnbestandteil angenommen werden, so beträgt der Gehalt des Harns an derselben sicherlich nicht mehr als 0,05 pro Mille, wie aus den Versuchen 4 und 5 zu ersehen ist.

abfiltriert und im Vakuum bei 50° des Wasserbades auf kleines Volumen eingengt. Man brachte nun die eingengte Flüssigkeit in einen 25 ccm-Meßkolben, versetzte mit Lithiumcarbonat im Überschuß, füllte nach Aufhören der Kohlensäureentwicklung mit Wasser bis zur Marke auf und filtrierte ab. In diesem Filtrat wurde α gemessen.

$$l = 2 \text{ dm}; \alpha = -0,07^\circ; c = 0,2469.$$

Hieraus ergab sich:

$$\frac{0,2469 \times 25}{100} = 0,0617 \text{ g Lithiumlactat} = 0,0579 \text{ g d-Milchsäure.}$$

Die Ausbeute betrug sonach 91,18%.

Versuch 5.

0,0690 g d-Milchsäure als Natriumsalz zu 1000 ccm Harn von einem Gesunden zugefügt und genau so behandelt wie Versuch 4. Die erhaltene Lithiumlactatlösung wurde auf 25 ccm aufgefüllt, filtriert und polarisiert.

$$l = 2 \text{ dm}; \alpha = -0,08^\circ; c = 0,2802.$$

Hieraus ergab sich:

$$\frac{0,2802 \times 25}{100} = 0,0701 \text{ g Lithiumlactat} = 0,0659 \text{ g d-Milchsäure.}$$

Die Ausbeute betrug sonach 95,51%.

Versuch 6.

0,2212 g d-Milchsäure wurden als Natriumsalz zu 100 ccm Harn von einem Gesunden hinzugefügt und in gleicher Weise wie bei Versuch 4 behandelt. Die erhaltene Lithiumlactatlösung wurde mit Wasser auf 25 ccm aufgefüllt, filtriert und polarisiert.

$$l = 2 \text{ dm}; \alpha = -0,26^\circ; c = 0,9198.$$

Hieraus ergibt sich:

$$\frac{0,9198 \times 25}{100} = 0,2300 \text{ g Lithiumlactat} = 0,2158 \text{ g d-Milchsäure.}$$

Die Ausbeute betrug sonach 97,56%.

Versuch 7.

0,2765 g d-Milchsäure in Natriumsalz übergeführt wurden zu 100 ccm Harn von einem Gesunden hinzugefügt und in gleicher Weise wie bei Versuch 4 behandelt.

$l = 2 \text{ dm}; \alpha = -0,32^\circ; c = 1,1360.$

Hieraus ergab sich:

$$\frac{1,1360 \times 25}{100} = 0,2840 \text{ g Lithiumlactat} = 0,2664 \text{ g d-Milchsäure.}$$

Die Ausbeute betrug mithin 96,35%.

Die Tabelle ergibt eine Übersicht der erhaltenen Werte.

Tabelle 4.

Ver- suchs- nummer	Menge der zugesetzten d-Milch- säure g	Rohr- länge dm	α	c	Menge des gefundenen Lithium- lactates g	Gefundene d-Milchsäure	
						g	% der zu- gesetzten Menge
4	0,0635	2	-0,07	0,2469	0,0617	0,0579	91,18
5	0,0690	2	-0,08	0,2802	0,0701	0,0659	95,51
6	0,2212	2	-0,26	0,9198	0,2300	0,2158	97,56
7	0,2765	2	-0,32	1,1360	0,2840	0,2664	96,35

Um die Frage zu entscheiden, ob bei der Bestimmung der d-Milchsäure im Harn auf dem polarimetrischen Wege die Bleibehandlung entbehrlich ist, wurden die folgenden Versuche ausgeführt.

Versuch 8.

0,3288 g d-Milchsäure als Natriumsalz zu 100 ccm Harn vom gesunden Menschen zugesetzt, eingedampft und mit Alkohol extrahiert. Der Destillationsrückstand der Alkoholauszüge wurde in wenig Wasser gelöst und dann 72 Stunden im Extraktionsapparat mit Äther bei phosphorsaurer Reaktion extrahiert. Der Destillationsrückstand des Ätherextraktes wurde nach Zusatz von Wasser und Lithiumcarbonat mit Tierkohle entfärbt, filtriert und gründlich mit heißem Wasser ausgewaschen. Das Filtrat und die Waschwässer wurden auf die gleiche Weise wie bei Versuch 4 behandelt und dann polarisiert.

$l = 2 \text{ dm}; \alpha = -0,38^\circ; c = 1,3531.$

Hieraus ergab sich:

$$\frac{1,3531 \times 25}{100} = 0,3383 \text{ g Lithiumlactat} = 0,3174 \text{ g d-Milchsäure.}$$

Die Ausbeute betrug sonach 96,53%.

Versuch 9.

0,6576 g d-Milchsäure als Natriumsalz zu 100 ccm Harn vom Gesunden hinzugefügt und in der gleichen Weise wie bei Versuch 8 behandelt.

$$l = 2 \text{ dm}; \alpha = -0,75^{\circ}; c = 2,7235.$$

Hieraus ergab sich:

$$\frac{2,7235 \times 25}{100} = 0,6809 \text{ g Lithiumlactat} = 0,6388 \text{ g d-Milchsäure.}$$

Die Ausbeute betrug sonach 97,15%.

Versuch 10.

0,9864 g d-Milchsäure als Natriumsalz zu 100 ccm Harn vom Gesunden hinzugefügt und auf die gleiche Weise wie bei Versuch 8 behandelt.

$$l = 2 \text{ dm}; \alpha = -1,10^{\circ}; c = 4,0765.$$

Hieraus ergab sich:

$$\frac{4,0765 \times 25}{100} = 1,019 \text{ g Lithiumlactat} = 0,9561 \text{ g d-Milchsäure.}$$

Die Ausbeute betrug sonach 96,93%.

Die Ergebnisse sind übersichtlich in folgender Tabelle zusammengestellt:

Tabelle 5.

Ver- suchs- nummer	Menge der zugesetzten d-Milch- säure g	Rohr- länge dm	α	c	Menge des gefundenen Lithium- lactates g	Gefundene d-Milchsäure	
						g	% der zu- gesetzten Menge
8	0,3288	2	-0,38	1,3531	0,3383	0,3174	96,53
9	0,6576	2	-0,75	2,7235	0,6809	0,6388	97,15
10	0,9864	2	-1,10	4,0765	1,0191	0,9561	96,93

Vergleicht man die in Tabelle 4 eingetragenen Werte der gefundenen d-Milchsäure mit den in Tabelle 5 zusammengestellten, so geht hervor, daß das Verfahren mit Bleibehandlung keine besseren Resultate liefert als das Verfahren ohne Bleibehandlung. Es kann also nicht bezweifelt werden, daß bei der Bestimmung der d-Milchsäure im Harn

auf dem polarimetrischen Wege die Bleibehandlung durchaus entbehrlich ist.

Endlich habe ich versucht, den mit d-milchsauren Salzen versetzten Harn bei phosphorsaurer Reaktion direkt im Extraktionsapparat mit Äther zu extrahieren und dadurch die Ausbeute an d-Milchsäure zu vermehren.

Versuch 11.

0,5909 g d-Milchsäure als Natriumsalz zu 100 ccm Harn vom Gesunden hinzugefügt, mit 15 ccm konzentrierter Phosphorsäure angesäuert und 72 Stunden im Extraktionsapparat mit Äther extrahiert. Der Destillationsrückstand des Ätherextrakts wurde mit wenig Wasser aufgenommen, mit Lithiumcarbonat im Überschuß auf dem Wasserbade digeriert, mit Tierkohle entfärbt, filtriert und gründlich mit heißem Wasser ausgewaschen. Das Filtrat und die Waschwässer wurden im Vakuum bei 50° des Heizwassers stark eingeeengt, in einen 25 ccm-Kolben gebracht, mit Wasser bis zur Marke aufgefüllt, filtriert und polarisiert.

$$l = 2 \text{ dm}; \alpha = -0,70^{\circ}; c = 2,5358.$$

Hieraus ergab sich:

$$\frac{2,5358 \times 25}{100} = 0,6339 \text{ g Lithiumlactat} = 0,5943 \text{ g d-Milchsäure.}$$

Die Ausbeute betrug sonach 100,65%.

Versuch 12.

0,5909 g d-Milchsäure als Natriumsalz zu 100 ccm Harn vom Gesunden hinzugefügt und auf die gleiche Weise wie bei Versuch 11 behandelt.

$$l = 2 \text{ dm}; \alpha = -0,69^{\circ}; c = 2,4975.$$

Hieraus ergab sich:

$$\frac{2,4975 \times 25}{100} = 0,6244 \text{ g Lithiumlactat} = 0,5858 \text{ g d-Milchsäure.}$$

Die Ausbeute betrug sonach 99,14%.

Versuch 13.

0,8273 g d-Milchsäure als Lithiumsalz zu 100 ccm Harn vom Gesunden hinzugefügt und auf die gleiche Weise wie bei Versuch 11 behandelt.

$$l = 2 \text{ dm}; \alpha = -0,95^\circ; c = 3,4889.$$

Hieraus ergab sich:

$$\frac{3,4889 \times 25}{100} = 0,8722 \text{ g Lithiumsalz} = 0,8183 \text{ g d-Milchsäure.}$$

Die Ausbeute betrug sonach 98,91%.

Versuch 14.

0,2364 g d-Milchsäure als Lithiumsalz zu 100 ccm Harn vom Gesunden hinzugefügt und auf die gleiche Weise wie bei Versuch 11 behandelt.

$$l = 2 \text{ dm}; \alpha = -0,28^\circ; c = 0,9913.$$

Hieraus ergab sich:

$$\frac{0,9913 \times 25}{100} = 0,2478 \text{ g Lithiumsalz} = 0,2325 \text{ g d-Milchsäure.}$$

Die Ausbeute betrug sonach 98,35%.

Zur leichteren Übersicht leite ich aus den geschilderten Versuchen folgende Tabelle ab:

Tabelle 6.

Ver- suchs- nummer	Menge der zugesetzten d-Milch- säure g	Rohr- länge dm	α	c	Menge des gefundenen Lithium- lactates g	Gefundene d-Milchsäure	
						g	% der zu- gesetzten Menge
11	0,5909	2	- 0,70	2,5358	0,6339	0,5943	100,65
12	0,5909	2	- 0,69	2,4975	0,6244	0,5858	99,14
13	0,8273	2	- 0,95	3,4889	0,8722	0,8183	98,91
14	0,2364	2	- 0,28	0,9913	0,2478	0,2325	98,35

Aus der Tabelle 6 ist zu ersehen, daß die direkte Extraktion der d-Milchsäure aus dem mit Phosphorsäure angesäuerten Harn mit Äther recht befriedigende Resultate lieferte, indem von der zugesetzten

d-Milchsäure 98,35—100,65% wiedergefunden wurden. Dieser Gang der Analyse ist deshalb recht empfehlenswert.

VI. Bestimmung der d-Milchsäure in Muskeln nach dem polarimetrischen Verfahren.

Wenn man die Milchsäure, resp. die milchsauren Salze aus dem Muskelbrei mit siedendem Wasser auszieht und dieses Verfahren oft wiederholt, so erhält man schließlich Auszüge, die keine Spur von milchsauren Salzen mehr zu enthalten scheinen. Daß der so erschöpfte Muskelbrei dennoch nicht unerhebliche Mengen von den milchsauren Salzen einschließt, hat vor kurzem Julius Mondschein¹⁾ durch Untersuchung außer Zweifel gestellt. Diese können nach v. Fürth²⁾ bestimmt werden, wenn man den Muskelbrei durch Kochen mit 10%iger Natronlauge aufschließt und dann aus der Lösung das Eiweiß durch Zusatz von Kochsalz in der Siedehitze ausfällt. In Übereinstimmung mit der Angabe von Julius Mondschein habe auch ich die Beobachtung gemacht, daß die Bestimmung der Milchsäure in den Muskeln nur dann möglich ist, wenn man zunächst die Muskelmasse durch Kochen mit verdünnter Schwefelsäure aufschließt und dann den Überschuß von Schwefelsäure mit Barytwasser entfernt.

Es mußte nun untersucht werden, welche von den beiden Aufschließungsmethoden das Vorzüglichste für die Bestimmung der d-Milchsäure auf dem polarimetrischen Wege leistet. Zu diesem Zwecke waren die folgenden Versuche angestellt.

Versuch 1.

Zerhacktes Rindfleisch wurde in zwei gleiche Portionen A und B von je 70 g geteilt.

Portion A. Diese Portion wurde nach der Vorschrift von Julius Mondschein mit siedendem Wasser ausgezogen und der Auszug und das Koagulum getrennt auf d-Milchsäure untersucht.

¹⁾ Julius Mondschein, Biochem. Zeitschrift, Bd. 42, S. 118.

²⁾ v. Fürth, a. a. O.

Der Auszug wurde zum dünnen Sirup eingengt und mit Alkohol erschöpft. Der Destillationsrückstand des Alkohol-extraktes wurde bei phosphorsaurer Reaktion 72 Stunden im Extraktionsapparat mit Äther extrahiert, aus dem Ätherextrakt auf die übliche Weise das Lithiumlactat dargestellt, die Lösung des letzteren auf 25 ccm gebracht, filtriert und polarisiert.

$$l = 2 \text{ dm}; \alpha = -0,63^{\circ}; = 2,2716.$$

Hieraus ergab sich:

$$\frac{2,2716 \times 25}{100} = 0,5679 \text{ g Lithiumlactat} = 0,5328 \text{ g d-Milchsäure.}$$

Das Koagulum wurde durch Erhitzen mit Natronlauge aufgeschlossen, die resultierende Lösung durch Sättigung mit Kochsalz in der Siedehitze und Ansäuern mit Schwefelsäure vom Eiweiß befreit; die eiweißfreie Lösung wurde auf die gleiche Weise wie der Auszug behandelt. Das Volumen der Lithium-lactatlösung betrug 25 ccm.

$$l = 2 \text{ dm}; \alpha = -0,02^{\circ}; c = 0,0704.$$

Hieraus ergab sich:

$$\frac{0,0704 \times 25}{100} = 0,0176 \text{ g Lithiumlactat} = 0,0165 \text{ g d-Milchsäure.}$$

$$\text{d-Milchsäure aus dem Auszug} \dots = 0,5328 \text{ g}$$

$$\text{d-Milchsäure aus dem Koagulum} = 0,0165 \text{ g}$$

$$\text{Summa} = 0,5493 \text{ g}$$

Portion B. Diese Portion wurde mit 300 ccm Wasser und 1,5 ccm konzentrierter Schwefelsäure versetzt und 1½ Stunden unter zeitweisem Ersatz des verdampfenden Wassers gekocht. Dabei löste sich die ganze Masse bis auf wenige Flöckchen. Die Flüssigkeit wurde durch Baryt von Schwefelsäure, durch Kohlensäure von überschüssigem Baryt befreit und auf dem Wasserbade zu einem dünnen Sirup (etwa 30 ccm) abgedampft. Der Sirup wurde mit 10fachem Volumen 95%igen Alkohols versetzt, nach 48stündigem Stehenlassen die klare alkoholische Lösung abgegossen und der Rückstand zweimal mit 150 ccm siedenden 95%igen Alkohols extrahiert. Der Destillationsrückstand der alkoholischen Auszüge wurde in Wasser gelöst, mit Phosphorsäure stark angesäuert und 72 Stunden im Extraktionsapparat mit Äther extrahiert. Der

Destillationsrückstand des Ätherextrakts in wenig Wasser gelöst, in 25 ccm-Kolben übergeführt, mit Lithiumcarbonat im Überschusse versetzt, mit Wasser genau bis zur Marke eingefüllt, filtriert und polarisiert.

$$l = 2 \text{ dm}; \alpha = -0,64^{\circ}; c = 2,3090.$$

Hieraus ergab sich:

$$\frac{2,3090 \times 25}{100} = 0,5772 \text{ g Lithiumlactat} = 0,5415 \text{ g d-Milchsäure.}$$

Versuch 2.

Vom zerhackten Rindfleisch wurden zwei gleiche Teile A und B zu je 70 g abgewogen.

Portion A. Aus dieser Portion wurden nach Angabe von Mondschein der Wasserauszug und das Koagulum hergestellt.

Die Bearbeitung des Wasserauszugs geschah auf die gleiche Weise wie bei Versuch 1. Das hierbei erhaltene Lithiumlactat wurde mit demjenigen aus dem Koagulum vereinigt und zur Bestimmung der d-Milchsäure verwendet.

Die Aufschließung des Koagulums erfolgte genau nach der Vorschrift von Mondschein. Aus der resultierten Lösung entfernte man die Hauptmenge des Eiweißes durch Neutralisation mit verdünnter Schwefelsäure ohne Zusatz von Kochsalz, dampfte das Filtrat auf dem Wasserbade zu einem dünnen Sirup ab und erschöpfte den Sirup mit Alkohol. Der Destillationsrückstand des Alkoholextraktes wurde zuerst zur Entfernung der fettigen Substanzen bei sodaalkalischer Reaktion 24 Stunden und dann bei phosphorsaurer Reaktion 72 Stunden im Extraktionsapparat mit Äther extrahiert. Die d-Milchsäure, welche beim Abdestillieren des Äthers zurückblieb, wurde durch Zusatz von Wasser und Lithiumcarbonat in Lithiumlactat übergeführt, samt dem aus dem Wasserauszug erhaltenen Lithiumlactat in 25 ccm-Kolben gebracht, mit Wasser bis zur Marke aufgefüllt, umgeschüttelt, filtriert und polarisiert.

$$l = 2 \text{ dm}; \alpha = -0,69^{\circ}; c = 2,4938.$$

Hieraus ergab sich:

$$\frac{2,4938 \times 25}{100} = 0,6235 \text{ g Lithiumlactat} = 0,5850 \text{ g d-Milchsäure.}$$

Es wurden gefunden:

0,5850 g d-Milchsäure in 70 g Muskelportion A.

Portion B. Diese Portion wurde durch mit 5 pro Mille Schwefelsäure aufgeschlossen und dann auf die gleiche Weise wie bei Portion B in Versuch 1 behandelt. Die hergestellte Lithiumlactatlösung in einen Kolben von 25 ccm eingegossen, mit Wasser genau bis zum Teilstrich aufgefüllt, filtriert und polarisiert.

$$l = 2 \text{ dm}; \alpha = -0,67^{\circ}; c = 2,4197.$$

Hieraus ergab sich:

$$\frac{2,4197 \times 25}{100} = 0,6049 \text{ g Lithiumlactat} = 0,5675 \text{ g d-Milchsäure.}$$

Die mitgeteilte Untersuchung hat bewiesen, daß bei Aufschließung der Muskelsubstanz nach Julius Mondschein die Ausbeute an d-Milchsäure eine bessere ist als bei Aufschließung der Muskelsubstanz mit Schwefelsäure von 5 Volumen pro Mille in der Siedehitze. Wenn nun auch beim Eindampfen der nach der Alkalimethode hergestellten Muskellösung reichliche Abscheidung der Salze erfolgt, die die nachherige Extraktion der milchsauren Salze mit Alkohol erschwert, und wenn auch schwerlich ein Gewinn an Zeit damit verknüpft ist, halte ich doch für empfehlenswert, die Alkalimethode in der bei Portion A in Versuch 2 beschriebenen Form auf die Aufschließung der Muskelsubstanz anzuwenden.

Jetzt stellte ich mir die Aufgabe, die Genauigkeit, mit der die d-Milchsäure in den Muskeln auf dem polarimetrischen Wege bestimmt werden kann, festzustellen. Zur Lösung dieser Aufgabe wurden folgende Versuche angestellt.

Versuch 3.

Die Muskeln von Kaninchen wurden durch die Fleischmaschine in einen gleichmäßigen Brei verwandelt, von dem vier Portionen von je 70 g abgewogen und nach dem oben beschriebenen Verfahren auf d-Milchsäure untersucht wurden, und zwar Portionen a und b sofort, Portion c nach Zusatz von 1,0347 g Zinklactat und Portion d nach Zusatz von 1,1584 g Lithiumlactat.

Portion a. Die erhaltene Lithiumlactatlösung wurde auf 25 ccm aufgefüllt und in 2 dm langem Rohr polarisiert.

$$\alpha = -0,46^{\circ}; c = 1,6444.$$

Hieraus ergab sich:

$$\frac{1,6444 \times 25}{100} = 0,4111 \text{ g Lithiumlactat} = 0,3857 \text{ g d-Milchsäure.}$$

Portion b. Die erhaltene Lithiumlactatlösung wurde auf die gleiche Weise wie bei Portion a behandelt.

$$l = 2 \text{ dm}; \alpha = -0,47^{\circ}; c = 1,6816.$$

Mithin:

$$\frac{1,6816 \times 25}{100} = 0,4204 \text{ g Lithiumlactat} = 0,3944 \text{ g d-Milchsäure.}$$

Es wurden sonach gefunden:

$$\text{Portion a} = 0,3857 \text{ g d-Milchsäure}$$

$$\text{» b} = 0,3944 \text{ »}$$

$$\text{Mittel} = \underline{0,3901 \text{ g}}$$

Bei Portionen c und d gibt die Differenz zwischen diesem Mittelwert 0,3901 und den gefundenen d-Milchsäuremengen die zugesetzte d-Milchsäure an.

Portion c. Die erhaltene Lithiumlactatlösung wurde in oben beschriebener Weise behandelt.

$$l = 2 \text{ dm}; \alpha = -1,27^{\circ}; c = 4,7543.$$

Mithin:

$$\frac{4,7543 \times 25}{100} = 1,1886 \text{ g Lithiumlactat} = 1,1151 \text{ g d-Milchsäure.}$$

$$\text{Gefundene d-Milchsäure} \dots \dots \dots = 1,1151 \text{ g}$$

$$\text{Mittelwert der präexistierenden d-Milchsäure} \dots = 0,3901 \text{ »}$$

$$\text{Wiedergefunden von } \underline{0,7655 \text{ g}} \text{ zugesetzter}$$

$$\text{d-Milchsäure} \dots \dots \dots = \underline{0,7250 \text{ g}}$$

Es wurden somit von der zugesetzten d-Milchsäure 94,72% wiedergefunden.

Portion d. Die Untersuchung der erhaltenen Lithiumlactatlösung geschah wie sonst.

$$l = 2 \text{ dm}; \alpha = -1,58^{\circ}; c = 6,0309.$$

Mithin:

$$\frac{6,0309 \times 25}{100} = 1,5077 \text{ g Lithiumlactat} = 1,4145 \text{ g d-Milchsäure.}$$

Gefundene d-Milchsäure = 1,4145 g
 Mittelwert der präexistierenden d-Milchsäure . = 0,3901
 Wiedergefunden von 1,0868 g zugesetzter

d-Milchsäure = 1,024

Es wurden also von der angewandten d-Milchsäure 94,26% wiedergefunden.

Die folgende Tabelle gibt die Übersicht der erhaltenen Ergebnisse:

Tabelle 7.

Num- mer der Por- tionen	Menge der zugesetzten Lactate g	Daraus be- rechnete d-Milch- säure- menge g	α	c	Menge des gefun- denen Lithium- lactates g	Daraus be- rechnete d-Milch- säure- menge g	Wieder- gefunden von der zu- gesetzten d-Milch- säure %
a	0	0	-0,46	1,6444	0,4111	0,3857	—
b	0	0	-0,47	1,6816	0,4204	0,3944	—
c	1,0347 Zn-Lactat	0,7655	-1,27	4,7543	1,1886	1,1151	94,72
d	1,1584 Li- >	1,0868	-1,58	6,0309	1,5077	1,4145	94,26

Versuch 4.

Von zerhackten Kaninchenmuskeln wurden Portionen a und b zu je 90 g abgewogen.

Portion a. Die Bearbeitung geschah wie sonst. Die erhaltene Lithiumlactatlösung wurde auf 25 ccm aufgefüllt und polarisiert.

$$l = 2 \text{ dm}; \alpha = -0,52^\circ; c = 1,8642.$$

Mithin:

$$\frac{1,8642 \times 25}{100} = 0,4661 \text{ g Lithiumlactat} = 0,4373 \text{ g d-Milchsäure.}$$

Portion b. 0,6195 g Zinklactat = 0,4583 g d-Milchsäure zu Muskelbrei zugefügt und auf obige Weise behandelt.

$$l = 2 \text{ dm}; \alpha = -1,00^\circ; c = 3,6839.$$

Mithin:

$$\frac{3,6839 \times 25}{100} = 0,9210 \text{ g Lithiumlactat} = 0,8641 \text{ g d-Milchsäure.}$$

Gefundene d-Milchsäure	= 0,8641 g
Präexistierende d-Milchsäure	= 0,4373 »
Wiedergefunden von 0,4583 g zugesetzter	
d-Milchsäure.	= 0,4268 g

Es wurden also von der zugesetzten d-Milchsäure **93,12%** wiedergefunden.

Wie aus den Ergebnissen von Versuchen 3 und 4 zu ersehen ist, beträgt die Ausbeute an der zum Muskelbrei zugefügten d-Milchsäure 93,12, 94,26, 94,72, im Mittel 94,03% des verlangten Wertes. Es unterliegt sonach keinem Zweifel, daß d-Milchsäure in Muskeln auch nach der von mir ausgearbeiteten optischen Methode bestimmt werden kann.

Verfehlen will ich nicht, hervorzuheben, daß es Julius Mondschein¹⁾ gelang, kleine Mengen freier β -Oxybuttersäure im normalen Muskel nachzuweisen. Obgleich ich weit davon entfernt bin, diese Angabe in Abrede zu stellen, bin ich doch davon fest überzeugt, daß unter normalen Verhältnissen eine so geringe Quantität der β -Oxybuttersäure, die «anscheinend für die Acidität des Muskels kaum in Betracht» kommt, keinen nennenswerten Einfluß auf die Bestimmung der d-Milchsäure nach dem polarimetrischen Verfahren ausübt.

VII. Bestimmung der bei der Muskelautolyse gebildeten d-Milchsäure nach dem polarimetrischen Verfahren.

Man hat sich wiederholt die Frage vorgelegt, ob nicht in den Muskeln ein milchsäurebildendes Ferment vorhanden ist, welches nach dem Absterben der Muskelzellen noch seine Wirkung entfalten kann. Das Verdienst, diese Frage zuerst auf experimentellem Wege entschieden zu haben, gebührt Katzujü Inouye und Kenro Kondo.²⁾ Sie digerierten die Muskeln von verschiedenen Tieren, wie Hunden, Kaninchen, Hühnern, Karpfen, mit Chloroform oder Toluol enthaltendem Wasser bei Bruttemperatur und beobachteten reichliche Bildung

¹⁾ Julius Mondschein, a. a. O., S. 123.

²⁾ K. Inouye und K. Kondo, Diese Zeitschr., Bd. 54, S. 481.

von d-Milchsäure, die vom 1. bis zum 4. Tage andauerte. Diese Milchsäurebildung wurde aber durch Kochhitze vollständig aufgehoben. Da das Leben der tierischen Zellen in Gegenwart von Toluol und Chloroform unmöglich ist, und da die Kochhitze allen fermentativen Wirkungen ein Ende machen muß, so haben die genannten Autoren¹⁾ den Satz aufgestellt, daß «die Entstehung der Rechtsmilchsäure in den autolysierten Muskeln nicht mit dem Zelleben im direkten Zusammenhang steht, sondern als rein chemischer Vorgang zu betrachten ist.» Dagegen ist von W. M. Fletcher²⁾ der Gedanke geäußert worden, daß die Muskelzellen sowohl bei Säugetieren als bei Amphibien nur im lebenden Zustande Milchsäure zu bilden vermögen, und daß «there is no subsequent «autolytic» production of lactic acid by muscle.» Dieser Gedanke hat aber jede Bedeutung und Berechtigung eingebüßt, seitdem durch Embden und seine Mitarbeiter³⁾ gezeigt worden ist, daß eine erhebliche Zunahme der Milchsäure im zellfreien Muskelpreßsaft «nach 1 bis 2 stündigem Stehen des letzteren bei 40°» erfolgt.

Im Anschluß an die fermentative Milchsäurebildung haben K. Inouye und K. Kondo sehr interessante Beobachtungen gemacht, denen zufolge bei der über 5 Tage fortgesetzten Autolyse der Muskeln sich stets eine milchsäurezerstörende Wirkung geltend macht. Daß diese Milchsäurezerstörung weder durch Mitwirkung der Mikroorganismen noch «durch eine vermehrte Milchsäurebindung durch Eiweiß» verursacht ist, vielmehr einem fermentativen Vorgang zuzuschreiben ist, hat Nicolaus Ssobolen⁴⁾ durch die unter Leitung v. Fürths ausgeführten Versuche außer Zweifel gestellt.

Die nachstehenden Versuche waren der Erledigung der Frage gewidmet: ob die Milchsäure, welche in den autolysierten Muskeln entsteht und beim Fortschreiten der Autolyse

¹⁾ K. Inouye und K. Kondo, a. a. O., S. 494.

²⁾ W. M. Fletcher, Journ. of Physiol., Bd. 43, S. 287—312.

³⁾ G. Embden und seine Mitarbeiter, Biochem. Zeitschr., Bd. 45, S. 45, 80.

⁴⁾ Nicolaus Ssobolen. Biochem. Zeitschr., Bd. 47, S. 367.

der Zerstörung anheimfällt, mit d-Milchsäure identisch ist. Die Art der Aufschließung der Muskelsubstanz war genau so wie oben beschrieben und die Bestimmung der darin enthaltenen d-Milchsäure fand stets auf polarimetrischem Wege statt.

Versuch 1.

Ein gut ernährter Hund wurde durch Verblutung aus der Carotis getötet. Die abpräparierten Muskeln wurden mit der Fleischhackmaschine in einen Brei verwandelt und 4 Portionen zu je 150 g abgewogen. Die Portionen 2 bis 4 wurden mit 600 ccm des nach der Vorschrift von Tamau Kikkoji¹⁾ hergestellten Chloroformwassers durchgemischt und bei 38° digeriert. Alle digerierten Portionen erwiesen sich, vor der Verarbeitung auf d-Milchsäure bakteriologisch untersucht, als völlig steril. Die erhaltene Lithiumlactatlösung wurde bei allen 4 Portionen auf 25 ccm aufgefüllt, filtriert und in 2 dm langem Rohr polarisiert. Die beifolgende Tabelle zeigt die Ergebnisse.

Tabelle 8.

Nummer der Portionen	Gewicht der Muskeln g	Dauer der Digestion	a	c	Daraus berechnete Menge	
					des Lithium- lactates g	der d-Milchsäure g
1	150	Sofort verarbeitet	— 0,58	2,0864	0,5216	0,4894
2	150	2 Tage	— 0,87	3,1852	0,7963	0,7471
3	150	4 „	— 0,88	3,2222	0,8056	0,7558
4	150	14 „	— 0,72	2,6173	0,6543	0,6139

Versuch 2.

Vom Muskelbrei von einem Kaninchen wurden 3 Portionen zu je 150 g abgewogen, die erste sofort auf d-Milchsäure verarbeitet, die übrigen jede für sich nach der Digestion mit

¹⁾ T. Kikkoji, Diese Zeitschr., Bd. 63, S. 109.

600 ccm Chloroformwasser. Die digerierten Portionen waren steril. Die erhaltene Lithiumlactatlösung wurde bei allen Portionen auf 25 ccm aufgefüllt, filtriert und in 2 dm langem Rohr Rohr polarisiert. Die Resultate sind in folgender Tabelle zusammengestellt.

Tabelle 9.

Nummer der Portionen	Gewicht der Muskeln g	Dauer der Digestion	α	c	Daraus berechnete Menge	
					des Lithiumlactates g	der d-Milchsäure g
1	150	Sofort verarbeitet	— 0,50	1,7901	0,4475	0,4198
2	150	1 Tag	— 0,97	3,5679	0,8920	0,8369
3	150	4 Tage	— 1,00	3,6790	0,9198	0,8630

Versuch 3.

Von den zerhackten Kaninchenmuskeln wurden 4 Portionen zu je 100 g abgewogen, die erste sofort auf d-Milchsäure verarbeitet, die übrigen jede für sich nach der Digestion mit 1000 ccm Chloroformwasser. Alle digerierten Portionen erwiesen sich als steril. Die erhaltene Lithiumlactatlösung wurde bei allen 4 Portionen auf 25 ccm aufgefüllt, filtriert und in 2 dm langem Rohr polarisiert. Die Ergebnisse übersieht man aus nachstehender Tabelle.

Tabelle 10.

Nummer der Portionen	Gewicht der Muskeln g	Dauer der Digestion	α	c	Daraus berechnete Menge	
					des Lithiumlactates g	der d-Milchsäure g
1	100	Sofort verarbeitet	— 0,58	2,0864	0,5216	0,4894
2	100	1 Tag	— 0,76	2,7654	0,6914	0,6487
3	100	2 Tage	— 0,77	2,8024	0,7006	0,6573
4	100	14 „	— 0,73	2,6481	0,6620	0,6211

Wie aus den angeführten Versuchen zu ersehen ist, gelang es mir, mit Hilfe des von mir ausgearbeiteten polarimetrischen Verfahrens festzustellen, einerseits daß bei der Autolyse der Muskeln der Säugetiere bei Bruttemperatur tatsächlich die Bildung von d-Milchsäure ohne Mitwirkung von Mikroorganismen erfolgt und andererseits, daß bei der Autolyse von langer Dauer sich eine fermentative Zerstörung der d-Milchsäure geltend macht, wenn auch nicht in so hohem Grade, wie R. S. Frew¹⁾ bei seinen Versuchen gefunden hatte.

VIII. Bestimmung der d-Milchsäure in der Leber nach dem polarimetrischen Verfahren.

Nachdem ich bewiesen habe, daß meine polarimetrische Methode für Ermittlung der d-Milchsäure in den Muskeln Vorzügliches leistet, erscheint es wünschenswert, festzustellen, ob sich der Gehalt der anderen tierischen Organe an d-Milchsäure auch auf dem polarimetrischen Wege bestimmen läßt. Hierzu einen Beitrag zu liefern, sind die nachstehenden Untersuchungen unternommen worden. Als Versuchsmaterial dienten Lebern von Rind und Kaninchen. Die Aufschließung der Lebern und die weitere Verarbeitung der aufgeschlossenen Leberlösung geschahen auf die gleiche Weise, wie bei Muskeln.

Versuch 1.

Vom Brei der frischen Rindsleber wurden 5 Portionen zu je 150 g abgewogen und folgendermaßen behandelt.

Portion a. Sofort auf d-Milchsäure verarbeitet. Die erhaltene Lithiumlactatlösung auf 25 ccm gebracht, filtriert und polarisiert.

$$l = 2 \text{ dm}; \alpha = -0,28^\circ; c = 0,9896.$$

Mithin:

$$\frac{0,9896 \times 25}{100} = 0,2474 \text{ g Lithiumlactat} = 0,2321 \text{ g d-Milchsäure.}$$

¹⁾ R. S. Frew, Diese Zeitschrift, Bd. 60, S. 15.

Portion b. Sofort auf d-Milchsäure verarbeitet. Die erhaltene Lithiumlactatlösung wurde auf 25 ccm aufgefüllt, filtriert und polarisiert.

$$l = 2 \text{ dm}; \alpha = -0,30^{\circ}; c = 1,0620.$$

Mithin:

$$\frac{1,0620 \times 25}{100} = 0,2655 \text{ g Lithiumlactat} = 0,2491 \text{ g d-Milchsäure.}$$

Es wurden sonach gefunden:

in Portion a 0,2321 g d-Milchsäure

» » b 0,2491 »

Mittel **0,2406 g d-Milchsäure.**

Portion c. 0,2284 g Lithiumlactat = 0,2143 g d-Milchsäure zu Leberbrei hinzugefügt und dann auf d-Milchsäure verarbeitet. Die erhaltene Lithiumlactatlösung wurde auf 25 ccm aufgefüllt, filtriert und polarisiert.

$$l = 2 \text{ dm}; \alpha = -0,52^{\circ}; c = 1,8642.$$

Mithin:

$$\frac{1,8642 \times 25}{100} = 0,4661 \text{ g Lithiumlactat} = 0,4373 \text{ g d-Milchsäure.}$$

Gefundene d-Milchsäure = 0,4373 g

Präexistierende d-Milchsäure = 0,2406

Wiedergefunden von **0,2143 g** zugesetzter

d-Milchsäure = **0,1967 g**

Es wurden also von der zugesetzten d-Milchsäure **91,78%** wiedergefunden.

Portion d. 0,4568 g Lithiumlactat = 0,4286 g d-Milchsäure zum Leberbrei hinzugefügt und dann auf d-Milchsäure verarbeitet. Die erhaltene Lithiumlactatlösung wurde auf 25 ccm aufgefüllt, filtriert und polarisiert.

$$l = 2 \text{ dm}; \alpha = -0,75^{\circ}; c = 2,7280.$$

Mithin:

$$\frac{2,7280 \times 25}{100} = 0,6820 \text{ g Lithiumlactat} = 0,6399 \text{ g d-Milchsäure.}$$

Gefundene d-Milchsäure = 0,6399 g

Präexistierende d-Milchsäure = 0,2406

Wiedergefunden von **0,4286 g** zugesetzter

d-Milchsäure = **0,3993 g**

Es wurden also von der zugesetzten d-Milchsäure **93,16%** wiedergefunden.

Portion e. 0,9136 g Lithiumlactat = 0,8571 g d-Milchsäure zum Leberbrei hinzugefügt und dann auf d-Milchsäure verarbeitet. Die erhaltene Lithiumlactatlösung wurde auf 25 ccm aufgefüllt, filtriert und polarisiert.

$$l = 2 \text{ dm}; \alpha = -1,22^\circ; c = 4,5560.$$

Mithin:

$$\frac{4,5560 \times 25}{100} = 1,1390 \text{ g Lithiumlactat} = 1,0686 \text{ g d-Milchsäure.}$$

Gefundene d-Milchsäure = 1,0686 g

Präexistierende d-Milchsäure = 0,2406 g

Wiedergefunden von **0,8571 g** zugesetzter

d-Milchsäure = **0,8280 g**

Es wurden also von der zugesetzten d-Milchsäure **96,61 g** wiedergefunden.

Versuch 2.

Vom Brei der frischen Hundeleber wurden 2 Portionen zu je 80 g abgewogen und behandelt wie folgt.

Portion a. Sofort auf d-Milchsäure verarbeitet. Die erhaltene Lithiumlactatlösung wurde auf 25 ccm aufgefüllt, filtriert und polarisiert.

$$l = 2 \text{ dm}; \alpha = -0,15^\circ; c = 0,5309.$$

Mithin:

$$\frac{0,5309 \times 25}{100} = 0,1327 \text{ g Lithiumlactat} = 0,1245 \text{ g d-Milchsäure.}$$

Portion b. 0,5958 g Lithiumlactat = 0,5590 g d-Milchsäure zum Leberbrei hinzugefügt und dann auf d-Milchsäure verarbeitet. Die erhaltene Lithiumlactatlösung wurde auf 25 ccm aufgefüllt, filtriert und polarisiert.

$$l = 2 \text{ dm}; \alpha = -0,77^\circ; c = 2,8025.$$

Mithin:

$$\frac{2,8025 \times 25}{100} = 0,7006 \text{ g Lithiumlactat} = 0,6573 \text{ g d-Milchsäure.}$$

Gefundene d-Milchsäure = 0,6573 g

Präexistierende d-Milchsäure = 0,1245 g

Wiedergefunden von **0,5590 g** zugesetzter

d-Milchsäure = **0,5328 g**

Es wurden also von der zugesetzten d-Milchsäure 95,31% wiedergefunden.

Die mitgeteilten Versuche zeigen, daß auf dem polarimetrischen Wege 91,78—96,61% von der zum Leberbrei zugesetzten d-Milchsäure wiedergefunden werden. Der Beweis für die Zuverlässigkeit meiner polarimetrischen Methode ist somit auch an der Leber erbracht worden.

Es ist mir eine angenehme Pflicht, an dieser Stelle Herrn Professor Osaka, dem Direktor des physikalisch-chemischen Instituts, für die Hilfe, die er mir bei der Berechnung der Formeln für die aus den Versuchsergebnissen konstruierten Kurven hat zuteil werden lassen, meinen besten Dank zu sagen.