

Zur Methodik der Milchsäurebestimmung in eiweißhaltigen Flüssigkeiten.

Von

Max Oppenheimer.

(Aus dem städtischen chemisch-physiologischen Institut zu Frankfurt a. M.)

(Der Redaktion zugegangen am 9. Dezember 1913.)

Vor einiger Zeit hat J. Mondschein¹⁾ durch Untersuchungen unter v. Fürths Leitung festgestellt, daß zu Eiweißlösungen und Muskelbrei zugesetzte und somit wohl auch vorgebildete Milchsäure in weitgehendem Maße — nach seinen Ermittlungen zu etwa einem Drittel — an Eiweiß gebunden wird und sich dadurch der Bestimmung im wässrigen Extrakte nach der Koagulation entzieht. Er schlägt deshalb vor, die Milchsäurebestimmung in zwei Teilen vorzunehmen, einmal im wässrigen Kochextrakte (Fraktion des Filtrates) durch Titration, und dann im Koagulum, welches er zunächst durch Kochen mit 10%iger Natronlauge aufschließt, dann durch Zusatz gesättigter Kochsalzlösung enteißt und neutralisiert (Fraktion des Koagulums), nach v. Fürth-Charnass. Die Addition der für beide Fraktionen erhaltenen Werte ergibt ihm dann die Gesamtmilchsäure.

Dieser Methode dürften aber, abgesehen von ihrer relativen Umständlichkeit, doch verschiedene Fehler anhaften. Gegen die direkte Titration des Kochextraktes spricht die Tatsache, daß bestimmt im Fleischsaft freie Phosphationen vorhanden sind, welche trotz der gegenteiligen Meinung Mondscheins nicht vernachlässigt werden dürfen. Zum mindesten müßte also der Titration eine Ätherextraktion des Filtrates vorangehen.

Noch schwerer sind die Bedenken, welche gegen ein Aufschließen des Koagulums mit 10%iger Natronlauge in der Hitze

¹⁾ J. Mondschein, Biochem. Zeitschr., Bd. 42, S. 105, 1912).

sprechen. Die bekannte Tatsache, daß Kohlenhydrate bei der Behandlung mit Alkali leicht sogar bis zu recht beträchtlichen Mengen in Milchsäure umgewandelt werden können, läßt die Gefahr nicht ausschließen, daß nach dem Mondscheinschen Verfahren durch Umwandlung im Muskel vorhandener Kohlenhydrate in Milchsäure eine tatsächlich nicht vorhandene Milchsäuremenge vorgetäuscht wird. Ebenso könnte vielleicht durch Alkali Milchsäure aus einer Milchsäurevorstufe im Muskel, dem Lactacidogen nach Embden, Kalberlah und Engel¹⁾ entstehen und so eine weitere Fehlerquelle bilden.

Nun liegen die Verhältnisse bei der Milchsäure in gewisser Beziehung ähnlich wie beim Zucker. Es ist seit langer Zeit bekannt, daß wesentliche Mengen Zuckers in Eiweißkoagula gehen und von diesen festgehalten werden. Diese Eigenschaft war die Veranlassung für die Einführung des Schenckschen Verfahrens zur Enteiweißung von eiweißhaltigen Zuckerlösungen.²⁾

Es zeigte sich nun bei den schon vor längerer Zeit im hiesigen Institute angestellten Versuchen, daß die Schencksche Methode auch für die Bestimmung von Milchsäure in eiweißhaltigen Flüssigkeiten die geeignetste ist zur vorherigen Entfernung von Eiweiß.

Eine andere in letzter Zeit zur Enteiweißung bei Zuckerbestimmungen empfohlene Methode unter Verwendung kolloidaler Eisenlösung³⁾ hatte für Milchsäure weder bei Blut- noch bei Hefesaft brauchbare Resultate ergeben. Ähnlich wie bei der Hitze-koagulation wurden hier offenbar vom Eiweiß etwa 30% der Milchsäure zurückgehalten.

Ganz anders war das Ergebnis bei Anwendung der Schenckschen Fällung. Eine vielleicht ursprünglich vorhandene Bindung der Milchsäure an Eiweiß wird anscheinend durch

¹⁾ Embden, Kalberlah und Engel, Biochem. Zeitschr., Bd. 45, S. 62, 1912.

²⁾ Abderhaldens Handbuch der biochemisch. Arbeitsmethoden, Bd. 2, S. 184.

³⁾ P. Rona und L. Michaelis, Biochem. Z., Bd. 7, S. 332, 1908. Vgl. Abderhaldens Handbuch der biochem. Arbeitsmethoden, Bd. 5, S. 173.

die Salzsäure der Schenckschen Fällung wieder gelöst. Der Hauptfehler, welcher der Hitzekoagulation anhaftet, fällt damit weg. Außerdem hat die Methode den großen Vorteil, daß nicht die gesamte für die Bestimmung der Milchsäure vorhandene Menge Flüssigkeit quantitativ aufgearbeitet werden muß, sondern aliquote Teile des entquecksilberten Schenck-Filtrates genommen werden können.

Embden und Kraus¹⁾ haben bereits ausführlich mitgeteilt, in welcher Weise im hiesigen Institute, in Blut und Leber Milchsäure bestimmt wird. Die Angaben genannter Autoren wurden in einer gleichzeitigen Mitteilung von S. Oppenheimer²⁾ aus dem hiesigen Institute, ergänzt, und die beschriebene Technik der Milchsäurebestimmung in Untersuchungen von Embden, Kalberlah und Engel³⁾ auch auf Muskelpreßsaft ausgedehnt.

Die ganze verbesserte Methodik ist überdies von Embden zusammenhängend im Handbuch der biochemischen Arbeitsmethoden beschrieben worden,⁴⁾ so daß von einer nochmaligen Wiedergabe abgesehen werden kann.

Dagegen sind die mit der verbesserten Methode, welche inzwischen in eigenen Untersuchungen auch bei Hefesaft angewandt wurde,⁵⁾ als Beleg für ihre Brauchbarkeit, zum Teil vor längerer Zeit ausgeführten Milchsäurebestimmungen noch nicht veröffentlicht, und dies soll deshalb hier nachgeholt werden.

I. Bestimmung der Milchsäure im Blute.

Zur Prüfung der Schenckschen Methode auf ihre Brauchbarkeit für die Bestimmung der Milchsäure im Blute wurde folgendermaßen verfahren:

Abgemessene Mengen defibrinierten Rinderbluts (A) wurden sofort nach Schenck unter sechsfacher Verdünnung des Blut-

¹⁾ G. Embden und F. Kraus, Biochem. Z., Bd. 45, S. 6, 1912.

²⁾ S. Oppenheimer, Biochem. Zeitschr., Bd. 45, S. 32, 1912.

³⁾ Embden, Kalberlah und Engel, l. c., S. 48.

⁴⁾ Abderhaldens Handbuch der biochemisch. Arbeitsmethoden, Bd. 5, S. 1254.

⁵⁾ Max. Oppenheimer, Diese Zeitschrift, Bd. 89, S. 45 und 63.

volumens gefällt, und in einem aliquoten Teile in der bekannten, im hiesigen Institute üblichen Weise die Milchsäure nach v. Fürth-Charnass unter vorheriger Ätherextraktion bestimmt.

Zu einer gleich großen Menge Blut (B) wurde eine gemessene Menge Zinklactatlösung von bekanntem Gehalte zugegeben, und dann ebenfalls unter sechsfacher Verdünnung nach Schenck gefällt. Auch in Portion B wurde dann in einem aliquoten Teile die Milchsäure nach v. Fürth-Charnass bestimmt.

Tabelle I. — Rinderblut.

1	2	3	4	5	6
Ver- suchs- Nr.	In Blut A gefundene Milchsäure pro 100 ccm Rinderblut vor Zusatz g	Zusatz von Milch- säure pro 100 ccm Rinder- blut g	Aus Kolonne 2 und 3 berechnete Gesamt-Milch- säuremenge pro 100 ccm Rinderblut g	In Blut B gefundene Gesamt- Milchsäure- menge pro 100 ccm Rinderblut g	Gefundene Gesamt-Milch- säuremenge in Prozenten der berechneten Gesamt- Milchsäure
1	0,0105	0,0583	0,0688	0,0596	86,6
2	0,0551	0,0490	0,1041	0,1008	96,8
3	0,0220	0,0490	0,0710	0,0632	89,0
4	0,0537	0,0639	0,1176	0,1050	89,3
5	0,0208	0,0639	0,0847	0,0768	90,7

Die Tabelle I zeigt die notwendigen analytischen Daten der Versuche. Aus Kolonne 2 geht die von vornherein in 100 ccm Blut A gefundene Milchsäuremenge hervor; aus Kolonne 3 die zu 100 ccm Blut zugesetzte, aus dem Zinklactat berechnete Milchsäuremenge. Kolonne 4 gibt die aus den beiden eben genannten Werten berechnete, Kolonne 5 die gefundene Gesamtmenge Milchsäure wieder. In Kolonne 6 ist die gefundene Gesamt-Milchsäuremenge in Prozenten der theoretisch berechneten Menge ersichtlich.

Die fünf vorliegenden Versuche geben einen durchschnittlichen Wert von 90,5%, welcher als ausreichend genau zu bezeichnen sein dürfte.

II. Bestimmung der Milchsäure im Muskelpreßsaft.

Beim Muskelpreßsaft wurde zur Eiweißfällung entsprechend dem gegenüber Blut geringeren Eiweißgehalt der Flüssigkeit

der mit gleichem Volumen Wasser verdünnte Saft mit nur je einem Volumen Salzsäure und Sublimat gefällt, also auf das Vierfache verdünnt. Im übrigen wurde die Bestimmung sowohl der vorgebildeten, als auch der Gesamtmilchsäure nach Zusatz wässriger Lactatlösung, ausgeführt wie bei Blut, nur daß bei den Filtraten aus Muskelpreßsaft wegen ihres hohen Milchsäuregehaltes die vorherige Einengung im Vakuum in Wegfall kam.

Tabelle II. — Muskelpreßsaft.

1	2	3	4	5	6
Ver- suchs- Nr.	In Saft A gefundene Milchsäure pro 100 ccm Preßsaft vor Zusatz g	Zusatz von Milch- säure. pro 100 ccm Preßsaft g	Aus Kolonne 2 und 3 berechnete Gesamt-Milch- säuremenge pro 100 ccm Preßsaft g	In Saft B gefundene Gesamt- Milchsäure- menge pro 100 ccm Preßsaft g	Gefundene Gesamt-Milch- säuremenge in Prozenten der berechneten Gesamt- Milchsäure
6	0,3420	0,1456	0,4876	0,4882	100,1
7	0,5557	0,1456	0,7013	0,6727	95,9

Die zwei Versuche der Tabelle II zeigen, daß die Schenck-Methode auch bei Muskelpreßsaft als Eiweißfällungsmittel für Milchsäurebestimmungen durchaus anwendbar ist. Der durchschnittliche Wert der gefundenen Milchsäure bei diesen Versuchen beträgt 98,0%.

III. Bestimmung der Milchsäure im Hefesaft.

Genau wie bei Blut und Muskelpreßsaft wurde auch für Hefesaft (Macerationssaft nach v. Lebedew) zur Entfernung des Eiweißes die Fällung nach Schenck angewandt und zwar in denselben Verhältnissen wie bei Blut, also unter sechsfacher Verdünnung. Eine Einengung vor der Extraktion war auch hier nicht nötig. Sonst gestaltete sich die Methodik ganz wie beim Blute. Beim Entquecksilbern des Schenck-Filtrates blieb ein Teil des Quecksilbersulfides kolloidal in Lösung, wodurch aber die nachherige Extraktion nicht beeinträchtigt wurde. Bei auftretender Emulsion wurde die Rührung vorübergehend abgestellt und entsprechend länger extrahiert.

Die Resultate von zwei Milchsäurebestimmungen zeigt die Tabelle III.

Tabelle III. — Hefesaft.

1	2	3	4	5	6
Ver- suchs- Nr.	In Saft A gefundene Milchsäure pro 100 ccm Hefesaft vor Zusatz g	Zusatz von Milch- säure pro 100 ccm Hefesaft g	Aus Kolonne 2 und 3 berechnete Gesamt-Milch- säuremenge pro 100 ccm Hefesaft g	In Saft B gefundene Gesamt- Milchsäure- menge pro 100 ccm Hefesaft g	Gefundene Gesamt-Milch- säuremenge in Prozenten der berechneten Gesamt- Milchsäure
8	0,3276	0,2130	0,5406	0,4956	91,6
9	0,2079	0,2130	0,4200	0,4183	99,6

Es zeigt sich auch bei Hefesaft, daß die Milchsäurebestimmung nach v. Fürth-Charnass unter vorangehender Enteiweißung nach Schenck durchaus befriedigende Werte gibt, bei den beiden mitgeteilten Versuchen im Durchschnitt 95,6%.

Die Fällung nach Schenck und die darauf folgende Bestimmung der Milchsäure nach Ätherextraktion in der im hiesigen Institute üblichen Weise führt also bei eiweißhaltigen Lösungen, insbesondere bei Blut, Preßsaft und Hefesaft zu durchaus brauchbaren Resultaten. Die Schenck-Fällung ist daher der Hitzeoagulation des Eiweißes durchaus vorzuziehen. Das Eisenverfahren nach Michaelis und Rona erwies sich für die Zwecke der Milchsäurebestimmung als nicht brauchbar.