

201. Mikrobestimmung von Milchsäure und Brenztraubensäure in der Leber

von Hugo Aebi.

(21. VII. 47.)

Die genaue Bestimmung kleinster Mengen von Milchsäure und Brenztraubensäure ist für die Biologie von grossem Interesse, da es sich um Zwischenprodukte des Kohlehydratstoffwechsels handelt. Während die Bestimmung des Milchsäuregehaltes von Blut und Muskulatur schon seit langem Gegenstand eingehender Untersuchungen — insbesondere derjenigen von *v. Fürth* und *Charnass*¹⁾, *Embden* und *Kraus*²⁾, sowie von *Oppenheimer*³⁾ — gewesen ist, haben Brenztraubensäurebestimmungen im Blut erst mit der Ausarbeitung genauer und spezifischer Methoden (*Kendall*⁴⁾, *Case*⁵⁾ und *Lu*⁶⁾) vermehrte Bearbeitung erfahren. Die Untersuchungen von *Embden*, *Meyerhof*, *Lehnartz* u. a. über den Milchsäuregehalt in der Muskulatur klärten den Energiestoffwechsel des quergestreiften Muskels auf und führten zur Aufstellung des bekannten *Embden-Meyerhof-Schemas*⁷⁾. Erst später wurde man auf die Bedeutung der Brenztraubensäure aufmerksam gemacht und es wurde festgestellt, dass es hierbei weniger auf die absoluten Werte als auf den Quotienten $Q = \text{Brenztraubensäure/Milchsäure}$ ankommt (*Johnson* und *Edwards*⁸⁾, *Friedemann* und *Barborika*⁹⁾, *Stotz* und *Bessey*¹⁰⁾). Demzufolge werden heute bei Bestimmung von Zwischenprodukten des Kohlehydratstoffwechsels Änderungen dieses Quotienten $Q = \text{BRS/MS}$ in den Mittelpunkt der Betrachtungen gestellt.

In Zusammenhang mit Untersuchungen, die den intermediären Kohlehydratstoffwechsel der Leber betreffen, wurde die in der vorliegenden Arbeit wiedergegebene Methodik zur Bestimmung von Milchsäure und Brenztraubensäure in der Leber ausgearbeitet. Die Bestimmungsmethoden selbst wurden mit einigen Abänderungen übernommen, die Milchsäurebestimmung von *Long*¹¹⁾ und die Brenztraubensäurebestimmung von *Lu* (l. c.). Aus Gründen der Über-

1) *Bioch. Z.* **26**, 199 (1910).

4) *J. Inf. Dis.* **47**, 176 (1930), zit. nach *Rona*.

2) *Bioch. Z.* **45**, 1 (1912).

5) *Biochem. J.* **26**, 753 (1932).

3) *Bioch. Z.* **45**, 32 (1912).

6) *Biochem. J.* **33**, 249 (1939).

7) *G. Embden*, *Chemismus der Muskelkontraktion und Chemie der Muskulatur*, in: *Handbuch der norm. u. patholog. Physiologie*, Bd. VIII/1, S. 369 ff. (Berlin 1925).

8) *J. Biol. Chem.* **118**, 427 (1937).

9) *J. Biol. Chem.* **141**, 993 (1941).

10) *J. Biol. Chem.* **143**, 625 (1942).

11) *Biochem. J.* **40**, 27 (1946).

sichtlichkeit und um Doppelspurigkeiten zu vermeiden wird auf die Entwicklung der Methodik dieser beiden Bestimmungen in den betreffenden Abschnitten des experimentellen Teiles kurz eingegangen werden.

Bei der Verarbeitung der Leber mussten andererseits teilweise neue Wege beschritten werden, da die modernen Methoden zur Bestimmung von Milchsäure und Brenztraubensäure, die heute zur Verfügung stehen, für Blut ausgearbeitet worden sind und sich nicht ohne weiteres auf die Bestimmung in Organen, in diesem Falle der Leber, übertragen lassen. Bei den gewonnenen Organextrakten handelt es sich um relativ grosse Flüssigkeitsmengen, die die zu bestimmenden Stoffe in weit geringerer Konzentration als im Blut enthalten. Abgesehen von den anderen Mengenverhältnissen ist es vor allem der ungleich höhere Gehalt an störenden Begleitstoffen, der eine besondere Vorbehandlung der gewonnenen Organextrakte, sowie die Modifikation der oben erwähnten Bestimmungsmethoden verlangt.

Experimenteller Teil.

1. Gewinnung der Organextrakte (für beide Bestimmungen).

Die in dieser Arbeit ausgeführten Bestimmungen von Milchsäure und Brenztraubensäure wurden ausschliesslich an Rattenlebern ausgeführt. Verwendet wurden Albino-ratten verschiedenen Alters, Geschlechts und Ernährungszustandes. Es wurde in folgender Weise vorgegangen:

Unmittelbar nach dem Töten durch Kopfschlag wird die Leber mit einigen Scherenschlägen entnommen, unter dem Kaltwasserstrahl sofort abgekühlt, zwischen zwei Filterpapierblättern abgetrocknet und dann in einem kleinen vorgewogenen Porzellanmörser, in den vorher näherungsweise die Hälfte des Lebergewichtes Quarzsand sowie 2 cm³ 10-proz. Trichloressigsäurelösung gegeben worden sind, sofort zu einem homogenen Brei verrieben. Beim Verreiben der Leber mit Quarzsand und wenig Trichloressigsäurelösung resultiert bereits nach ca. 5 Sekunden ein allerdings noch grober Brei von gefällttem Organeweiss. Zu diesem Zeitpunkt ist jedenfalls alles Organeweiss gefällt und somit jede weitere Enzymtätigkeit unterbunden. Vom Moment der Entnahme der Leber bis zur Eiweissfällung soll eine möglichst kurze Zeitdauer verstreichen. Diese konnte in Serienversuchen auf ca. 20 Sek. heruntergedrückt werden. Nach 3 Minuten langem Verreiben erhält man einen homogenen feinen Brei. Durch Wägung des Porzellanmörseres lässt sich aus der beobachteten Differenz das Lebergewicht mit einer Genauigkeit von $\pm 0,02$ g bestimmen. (Bei einem Lebergewicht von ca. 5–6 g = $\pm 0,5\%$). Durch portionenweise Zugabe der 2,5-fachen Menge 10-proz. Trichloressigsäurelösung (die schon anfangs zugesetzten 2 cm³ sind darin inbegriffen) wird der Brei unter Umrühren zu einer Suspension verdünnt. Nach 10 Minuten langem Zentrifugieren wird die überstehende Flüssigkeit dekantiert und der Rückstand nochmals mit der 2,5-fachen Menge 10-proz. Trichloressigsäurelösung versetzt, mit einem Glasstab gut umgerührt und zentrifugiert. In gleicher Weise wird ein drittes Mal vorgegangen. Die drei Portionen des Organextraktes werden vereinigt und enthalten nun praktisch alle in der Leber vorhandene Milchsäure und Brenztraubensäure.

Wie Versuche mit getrennter Verarbeitung der verschiedenen Portionen gezeigt haben, erhält man bei dreimaligem Auswaschen eine Ausbeute von 98,0–98,8%. Die Verwendung von grösseren Mengen Quarzsand (1 g pro 1 g Organ) beim Verreiben der Leber senkt die Ausbeute auf ca. 96%. Darüber orientiert nachfolgende tabellarische Zusammenstellung.

Tabelle 1.

Milchsäuregehalt der verschiedenen Portionen bei fraktionierter Extraktion der mit 10-proz. Trichloressigsäurelösung und der halben Gewichtsmenge Quarzsand verriebenen Rattenleber. Die Leber wurde pro 1 g Frischgewicht 5mal mit je 2,5 cm³ einer 10-proz. Trichloressigsäurelösung extrahiert.

Versuch Nr.	1		2		3	
	absolut	relativ	absolut	relativ	absolut	relativ
erste Extraktion	2,49 mg	70,1%	2,50 mg	72,0%	1,89 mg	67,7%
zweite Extraktion	0,79 mg	22,2%	0,77 mg	22,2%	0,65 mg	23,1%
dritte Extraktion	0,21 mg	5,9%	0,16 mg	4,6%	0,20 mg	7,2%
vierte Extraktion	0,05 mg	1,5%	0,04 mg	1,1%	0,05 mg	2,0%
fünfte Extraktion	0,01 mg	0,3%	0,005 mg	0,1%	0	0
(sechste Extraktion)	0	0	0	0	0	0
Total	3,55 mg	100 %	3,47 mg	100 %	2,79 mg	100 %
davon in den ersten drei Extraktionen:	3,49 mg	98,2%	3,43 mg	98,8%	2,74 mg	98,0%

Zu Kontrollzwecken wurde der Rückstand der Trichloressigsäurefällung der Leber ein sechstes Mal während 24 bzw. 48 Stunden extrahiert, doch liess sich darin in keinem Falle Milchsäure oder Brenztraubensäure nachweisen. Es darf somit angenommen werden, dass bei diesem Vorgehen alle Milchsäure und BRS erfasst wird. Eine Vereinfachung dieses Vorgehens lässt sich bei approximativer Bestimmung dadurch erzielen, dass die Leber in beschriebener Art und Weise mit der 5-fachen Menge 10-proz. Trichloressigsäurelösung zu einer Suspension verrührt wird und nach dem Zentrifugieren von der überstehenden Flüssigkeit ein aliquoter Teil weiter verarbeitet wird. Die so erhaltene, meist trübe, opaleszierende Flüssigkeit enthält neben den zu bestimmenden Stoffen grössere Mengen von Glykogen, Glucose, Lipoiden u. a. m.

2. Vorbehandlung der Organextrakte (für beide Bestimmungen).

Die direkte Verwendung der Trichloressigsäureauszüge zur Brenztraubensäurebestimmung, wie dies von *Lu* (loc. cit.) auch für Gewebe angegeben worden ist, hat sich, wenigstens bei der Leber, wegen des auftretenden *Tyndall*-Effektes und wegen der Neigung zur Emulsionsbildung bei der Extraktion mit Äthylacetat als undurchführbar erwiesen. Die vorherige Entfernung des störenden Glykogens und anderer Kolloide ist daher erforderlich. Wenn auch die direkte Verwendung dieser Lösung zur Milchsäurebestimmung nach *Long* (loc. cit.) durchaus statthaft ist, so empfiehlt es sich gleichwohl — besonders bei glykogenreichen Lebern — die Kohlehydrate zu entfernen, da diese die wirksame Cer(IV)-sulfatkonzentration im Verlauf der Bestimmung herabsetzen, indem sie Cer(IV) zu Cer(III) reduzieren, allerdings ohne flüchtige hydrogensulfidbindende Substanzen zu bilden. Die Beseitigung der störenden Kohlehydrate im Extrakt geschieht am einfachsten mit Hilfe der „Kupfer-Kalk-Fällung“ von *Salkowski*¹⁾. Während diese Methode schon von manchen Autoren bei der Milchsäurebestimmung im Blut und Muskel angewandt worden ist, lässt sie sich in der üblichen Ausführung für die Brenztraubensäurebestimmung nicht anwenden, da hierbei je nach der BRS-Konzentration Verluste von 20% und mehr auftreten. Während *Klein*²⁾ bei der Kupfer-Kalk-Fällung bei Konzentrationen von 0,4—0,7 mg % BRS in der Analysenlösung Verluste von 0—22% feststellte, beobachtete *Huszak*³⁾ eine Verminderung der Ausbeute um nur 5—8%. Wie eigene

1) zit. n. *Anrep* und *Cannon*, Am. J. Physiol. **58**, 244 (1923).

2) J. Biol. Chem. **135**, 143 (1940).

3) Bioch. Z. **307**, 184 (1941).

Vorversuche gezeigt haben, erhält man 96—100% Ausbeute, wenn man bei der Erzeugung der Fällung nur schwach alkaliert und sofort davon abfiltriert, statt das Gemisch eine halbe Stunde unter öfterem Schütteln stehen zu lassen. Folgendes Verfahren hat brauchbare Resultate gezeitigt:

Zu 20 cm³ des trichloressigsäuren Extraktes gibt man 5 cm³ einer 5-proz. Ca(OH)₂-Suspension und 2 cm³ 10-proz. CuSO₄-Lösung und setzt tropfenweise 30-proz. NaOH zu, bis zum Auftreten einer blauen, voluminösen Fällung; Phenolphthalein soll eben gerötet werden. Nach einmaligem kurzem Schütteln wird sofort durch ein Faltenfilter filtriert. Bei diesem Vorgehen wird alles Glykogen aus der Lösung entfernt, ebenso grösstenteils die Glucose. Aus dem erhaltenen Filtrat I müssen nun zur Bestimmung der Brenztraubensäure die noch vorhandenen Ca⁺⁺-Ionen entfernt werden, da diese sonst ihrerseits eine Trübung der zu photometrierenden sodaalkalischen Lösung verursachen würden. Zu diesem Zweck werden 20 cm³ des Filtrates I mit 2 cm³ 10-proz. Sodalösung versetzt, kräftig geschüttelt und vom CaCO₃ abfiltriert. Das Filtrat II wird sogleich mit 2 cm³ 2-n. HCl angesäuert. Die so erhaltene Lösung ist eiweiss- und glykogenfrei, wasserklar und enthält — unter Berücksichtigung der bei der Vorbehandlung erfolgten Verdünnung — alle im trichloressigsäuren Leberextrakt vorhandene Milchsäure und Brenztraubensäure. Wie unten gezeigt wird, stören die Spuren von Glucose, die bei diesem „abgeschwächten“ Kupfer-Kalk-Fällungsverfahren ins Filtrat gelangen, nicht.

Bei der Berechnung des Milchsäure- und BRS-gehaltes der Leber werden die bei der Kupfer-Kalk-Fällung und Ca⁺⁺-Fällung erfolgten Verdünnungen berücksichtigt, indem das Ergebnis der Bestimmung mit dem Produkt der drei Verdünnungsquotienten multipliziert wird, z. B. 1. Kupfer-Kalk-Fällung $Q_1 = 28,0/20,0 = 1,40$; 2. Ca⁺⁺-Fällung $Q_2 = 22,0/20,0 = 1,10$; 3. Ansäuern $Q_3 = 22,0/20,0 = 1,10$. Das Produkt dieser Quotienten beträgt in diesem Fall: $1,40 \times 1,10 \times 1,10 = 1,69$.

Tabelle 2.

Einfluss der Kupfer-Kalk-Fällung und Ca⁺⁺-Fällung auf den Milchsäure- und Brenztraubensäuregehalt des trichloressigsäuren Leberextraktes.

Milchsäure	direkt	nach Vorbehandlung	Verdünnungsquotient Q	nach Vorbehandlung mit Q multipliziert	Ausbeute
Exp. 1	0,352 mg	0,207 mg	1,73	0,358 mg	101,6%
Exp. 2	0,302 mg	0,177 mg	1,72	0,304 mg	100,5%
BRS (Lösung von Na-Pyruvinat, Zusatz von 1% Glykogen)					
Exp. 4a und c: Kupfer-Kalk-Fällung nach Orig.-Vorschrift + Ca ⁺⁺ -Fällung					
Exp. 4a	18,3 γ	8,3 γ	1,77	14,7 γ	80,4%
Exp. 4c	19,1 γ	8,2 γ	1,78	14,6 γ	76,5%
Exp. 4b und d: Kupfer-Kalk-Fällung, modifiziert + Ca ⁺⁺ -Fällung					
Exp. 4b	18,3 γ	10,7 γ	1,73	18,5 γ	101,0%
Exp. 4d	19,1 γ	11,2 γ	1,725	19,2 γ	100,5%

Zur Beseitigung des störenden Glykogens wurden noch andere Fällungsverfahren (BaSO₄, CaCO₃ allein) auf ihre Brauchbarkeit untersucht, doch waren diese Bemühungen ohne Erfolg. Es mußte daher auf das Kupfer-Kalk-Fällungsverfahren zurückgegriffen werden. Wie diese Versuche zeigen, gelingt es bei Einhaltung obiger Kautelen, das Auftreten von Verlusten bei der Fällung zu verhindern.

3. Bestimmung der Milchsäure.

Das Prinzip der titrimetrischen Bestimmungsmethoden, die von den eingangs erwähnten Autoren fast ausschliesslich verwendet worden sind, ist folgendes: Nach Oxy-

dation der Milchsäure in siedender Lösung durch Kaliumpermanganat zu Acetaldehyd wird der überdestillierte Acetaldehyd mittels eines Hydrogensulfitüberschusses abgefangen und gebunden. Nach Beseitigung des überschüssigen freien Hydrogensulfits mit Jodlösung wird die gebildete Acetaldehyd-Hydrogensulfitverbindung durch Zusatz von pulverisiertem Na_2HPO_4 gespalten und die bei der Spaltung frei gewordene Hydrogensulfitmenge mit 0,01-n. oder 0,005-n. J_2 -Lösung jodometrisch bestimmt. Am bekanntesten sind die Verfahren von *Hirsch-Kaufmann*¹⁾ und *Friedemann* et al.²⁾.

Diese Methoden wurden sukzessive verbessert und vereinfacht (*Friedemann* und *Kendall*³⁾, *Lieb* und *Zacherl*⁴⁾, *Edwards*⁵⁾), doch konnte ihr hauptsächlichster Nachteil, der störende Einfluss mancher biologisch wichtiger Stoffe, zwar verringert, doch nicht ausgeschaltet werden. Es ist zu bedenken, dass es sich bei diesen Verfahren nicht um eine streng spezifische Reaktion handelt; alle diejenigen Stoffe wirken störend, die bei Oxydation in kochender wässriger Lösung bei saurer Reaktion flüchtige hydrogensulfitbindende Stoffe bilden⁶⁾. Im Bestreben, die Spezifität dieser Methode zu erhöhen, haben *Gordon* und *Quastel*⁷⁾ 1939 als Oxydationsmittel eine 10-proz. Lösung von Cer(IV)-sulfat eingeführt. Dieses Verfahren wurde von *Long* (l. c.) 1946 verbessert und vereinfacht. Da es sich hierbei nicht um eine Destillation, sondern lediglich um eine Durchlüftung der Cer(IV)-sulfat enthaltenden Lösung bei 60° C handelt, konnte der störende Einfluss der in Frage kommenden Substanzen (Glykogen, Stärke, Glucose, Fructose, Brenztraubensäure, Citronensäure usw.) auf ein Minimum reduziert werden, wie die Untersuchungen obiger Autoren und auch eigene Versuche gezeigt haben. Die Methode von *Long* (loc. cit.), die für die Bestimmung im Blut ausgearbeitet worden ist, ist hier in modifizierter Form, geeignet für Untersuchungen in Organextrakten wiedergegeben worden.

Apparatur und Prinzip: Der verwendete Apparat (Fig. 1), bestehend aus 6—8 Einheiten, ist relativ einfach gebaut und eignet sich gut für Serienbestimmungen. Eine solche Einheit besteht aus einem Durchlüftungsgefäß (A), einem überleitenden Glasrohr (B) und einem mit Glasperlen gefüllten Absorptionsturm (C). Die Durchlüftungsgefäße,

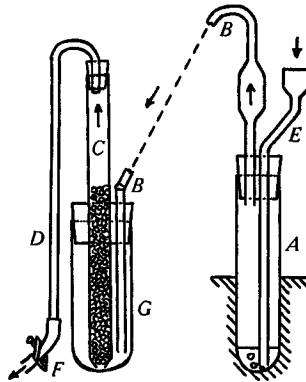


Fig. 1.

Schematische Darstellung der Apparatur zur Bestimmung von Milchsäure (modif. nach *Long*).

¹⁾ Z. physiol. Ch. **140**, 25 (1924).

²⁾ J. Biol. Chem. **73**, 335 (1927).

³⁾ J. Biol. Chem. **82**, 23 (1929).

⁴⁾ Z. physiol. Ch. **211**, 211 (1932).

⁵⁾ J. Biol. Chem. **125**, 571 (1938).

⁶⁾ Zusammenstellung der hierbei störenden Stoffe, siehe *Clausen* (J. Biol. Chem. **52**, 263 (1922)); *Friedemann* et al. (loc. cit.) und *Gordon* und *Quastel* (loc. cit.).

⁷⁾ Biochem. J. **33**, 1332 (1939).

in welche die Analysenlösung und Cer(IV)-sulfatlösung gegeben werden, tauchen in ein Wasserbad von 60° C. Die Absorptionstürme stehen durch Schlauchleitung (D) mit einer Wasserstrahlpumpe in Verbindung. Das Prinzip dieser Methode beruht nun darauf, dass die Milchsäure durch einen Überschuss von Cer(IV)-sulfat in saurer Lösung bei 60° C zu Acetaldehyd oxydativ gespalten wird. Damit der entstandene Acetaldehyd sich nicht zu Essigsäure weiter oxydiert, wird er durch die Luftblasen, die aus einem bis nahe an den Boden reichenden Glasrohr (E) durch die Lösung perlen, sofort aus der Reaktionsflüssigkeit entfernt. Der mit dem Luftstrom mitgerissene Acetaldehyd wird im Absorptionsturm vom im Überschuss vorhandenen Hydrogensulfit abgefangen. Diese Reaktion verläuft innert 30 Minuten quantitativ.

Herstellung der erforderlichen Lösungen: a) Cer(IV)-sulfatlösung.

Da Cer(IV)-sulfat z. Z. schwer erhältlich ist, wurde die für die Bestimmung benötigte 5-proz. Cer(IV)-sulfatlösung in 2-n. H_2SO_4 aus Ceroxyd (technisch) nach den Angaben von *Kolthoff*¹⁾ dargestellt und daraus in einer Ausbeute von 33–34% erhalten. Der Titer an Cer(IV)-sulfat wurde jodometrisch bestimmt, indem 1 cm³ der Cer(IV)-sulfatlösung zu 2 cm³ 10-proz. KJ-Lösung und 5 cm³ HCl (konz. 1:10 verdünnt) langsam unter Umschwenken zugetropfelt wurde und das durch Reduktion des Cer(IV) zu Cer(III) in Freiheit gesetzte Jod mit 0,1-n. $Na_2S_2O_3$ -Lösung titriert wurde. 1 cm³ verbrauchter 0,1-n. $Na_2S_2O_3$ -Lösung entspricht 33,2 mg Cer(IV)-sulfat. Die Verwendung einer 5-proz. Cer(IV)-sulfatlösung erwies sich als ebenso geeignet wie die von *Long* (loc. cit.) gebrauchte Lösung, die einen Oxydationstiter von ca. 10% aufweist.

b) Eine 1-proz. Natriumpyrosulfitlösung ($Na_2S_2O_5$) zum Abfangen des Acetaldehyds.

Ausführung der Bestimmung.

5 cm³ der ca. 0,05-0,4 mg Milchsäure enthaltenden Analysenlösung (bzw. destilliertes Wasser beim Blindversuch) werden mittels einer Pipette in das Durchlüftungsgefäß eingefüllt, nachdem in den Absorptionsturm 4 cm³ 1-proz. Natriumpyrosulfitlösung gegeben worden sind und das ganze Durchlüftungssystem auf einwandfreies Funktionieren geprüft worden ist. Nach Einschalten der Saugpumpe werden die an den Zweigleitungen zu den verschiedenen Einheiten angebrachten Schraubenklemmen (F) derart reguliert, dass alle Proben gleichmässig durchlüftet werden (ca. 12–15 Luftblasen pro Sekunde, d. h. so, dass die einzelnen Blasen gerade noch wahrgenommen werden können). Nun werden zu jeder Probe 10 cm³ 5-proz. Cer(IV)-sulfatlösung durch das zuleitende Glasrohr (E) zur Milchsäurelösung gegeben, wobei darauf zu achten ist, dass die Durchlüftung keinen Moment unterbrochen wird. Nach 30 Minuten wird abgestellt und die Verbindungen gelöst. Absorptionsturm, Glasrohr und Gefäß (G), in welchem der Absorptionsturm aufgestellt ist, werden gut mit destilliertem Wasser ausgespült und dieses quantitativ in einen 200 cm³-Erlenmeyerkolben übergeführt (total ca. 80–90 cm³ Spülwasser). Die Bestimmung der Aldehyd-Hydrogensulfitverbindung erfolgt nach Wegtitration des Hydrogensulfitüberschusses mit Jodlösung (zuerst mit 0,03-n., dann 0,002-n. J_2 -lösung) und Spaltung derselben mit Na_2HPO_4 durch Titration mit 0,005-n. Jodlösung. Unter Verwendung von 6 Tropfen einer 1-proz. Stärkelösung als Indikator wird beide Male bis zum selben Endpunkt titriert (schwache Hellblautönung der Lösung). Es entspricht 1 cm³ 0,005-n. Jodlösung 0,225 mg Milchsäure. In 2 Stunden lassen sich so 6–8 Bestimmungen ausführen. Die Grösse des Blindwertes, der zwischen 0,05-0,08 cm³ 0,005-n. J_2 -lösung schwankt, hängt von der Reinheit des destillierten Wassers und vor allem vom Gehalt der durchgeströmten Luft an Aldehyd- und Acetondämpfen ab. Selbst kleinste Spuren dieser Dämpfe in der Luft des Arbeitsraumes können eine beträchtliche Erhöhung des Blindwertes verursachen.

Die mit Standardlösungen von reinstem Lithiumlactat durchgeführten Kontrollanalysen haben bei einer Milchsäuremenge von 0,2–0,4 mg eine Ausbeute von 98,1 bis 99,0% ergeben. *Long* (l. c.) erhielt 99,4–101,2%. Die methodischen Untersuchungen

¹⁾ *Kolthoff*, Die Massanalyse, Verlag Springer, Berlin 1931, S. 535, siehe auch: *Willard und Young* (Am. Soc. **50**, 1222 und ff. (1928)).

wurden teilweise mit einem Lithiumlactatpräparat durchgeführt, bei welchem ein Milchsäuregehalt von 84,1% ermittelt wurde¹). Es wurde der Zusatz von Brenztraubensäure (0,4 mg/A.), Glucose (50 mg/A.), Glykogen (50 mg/A.) und Trichloressigsäure (10-proz. Lösung) zu Lactatlösungen auf ihren störenden Einfluss untersucht, doch konnte in keinem Falle ein solcher festgestellt werden.

4. Bestimmung der Brenztraubensäure.

Die heute gebräuchlichen Methoden zur Bestimmung der Brenztraubensäure (= BRS) beruhen auf der kolorimetrischen Messung der Rotfärbung, die das 2,4-Dinitrophenyl-hydrazon der BRS bei alkalischer Reaktion zeigt. Bei der Methode von *Lu* (loc. cit.), die am meisten Verwendung gefunden hat, ist das Prinzip der Bestimmung folgendes: Das nach Zugabe von 2,4-Dinitrophenyl-hydrazin zur sauren Analysenlösung entstandene Hydrazon der BRS wird durch Ausschütteln mit Äthylacetat extrahiert, wobei neben dem BRS-Hydrazon auch alle andern Hydrazone und das überschüssige Hydrazin mitextrahiert werden. Bei der Re-extraktion des Äthylacetats mit Sodalösung geht nun nur das BRS-Hydrazon in die Sodalösung über. Nach Zusatz von NaOH zum Sodaextrakt wird die Intensität der aufgetretenen Rotfärbung kolorimetrisch bestimmt. Die Hydrazone der höheren homologen Ketosäuren, die durch die Sodalösung ebenfalls mitextrahiert werden, zeigen eine 2–3 mal schwächere Rotfärbung, die nach einigen Minuten verschwindet (*Long*, l. c.). Der einzige Nachteil dieser Methode besteht darin, daß sie bei der Durchführung von Reihenuntersuchungen etwas umständlich und zeitraubend ist. Leider hat sich indessen die viel einfachere zu handhabende Brenztraubensäurebestimmung nach *Straub*²), die auf der Braunfärbung der o-Oxybenzal-BRS beruht, als zu wenig empfindlich erwiesen (Zusatz von Salicylaldehyd zu BRS-Lösungen bei stark alkalischer Reaktion). Diese Methode leistet z. B. bei der Verfolgung des BRS-Abbaues gute Dienste, nicht aber bei der Bestimmung des absoluten Gehaltes im Blut oder Organen. Zudem hat die Gegenwart von Kohlehydraten (*Huszak*³)), sowie der Enteiweissungsvorgang selber (*Straub*, loc. cit.) einen störenden Einfluss auf die Bestimmung.

Erforderliche Lösungen: 1-promill. Lösung von 2,4-Dinitrophenyl-hydrazin in 2-n. HCl, 10-proz. Sodalösung, 3-n. NaOH, Äthylacetat Ph. H. V.

Ausführung der Bestimmung: Die für Blut ausgearbeitete Originalvorschrift (Ausgangsmaterial ist 0,1–0,2 cm³ Blut) wurde für unsern Zweck in folgender Weise modifiziert:

5 cm³ in beschriebener Weise vorbehandelten Extrakts werden in einem Reagensglas (150×40 mm) mit 1 cm³ 1-prom. 2,4-Dinitrophenylhydrazinlösung in 2-n. HCl versetzt, die Lösungen durch Schütteln gut gemischt und 15 Minuten zwecks quantitativer Bildung des Hydrazons stehen gelassen. Nun wird mit 4 cm³ Äthylacetat extrahiert (½ Minute), indem das mit einem Gummistopfen verschlossene Reagensglas kontinuierlich umgeschwenkt wird. Nach Trennung der beiden Phasen wird die untere wässrige Schicht, die den grössten Teil des Hydrazons, sowie das überschüssige Hydrazin an das Äthylacetat abgegeben hat, mittels einer fein ausgezogenen und mit Gummihütchen versehenen Pipette entfernt und in ein zweites Reagensglas übergeführt. Darin wird die wässrige Lösung ein zweites Mal mit 2 cm³ und ein drittes Mal mit 1 cm³ Äthylacetat extrahiert (je ½ Minute). Nach Trennung der Schichten werden diese mit einer fein ausgezogenen Pipette abgehebert und zur ersten Äthylacetatportion ins Reagensglas (1) gegeben. Nach dreimaliger Extraktion ist alles Hydrazon und das überschüssige Hydrazin in das Äthylacetat übergegangen. Die wässrige Lösung, die nun farblos sein soll, wird verworfen und in dasselbe Reagensglas (2) 4 cm³ 10-proz. Sodalösung gegeben. Nach mehrmaligem Umschwenken wird die Sodalösung zum Äthylacetat ins Röhrchen (1) gegossen

¹) Hr. Dr. *A. Walser* vom Physiolog.-chemischen Institut der Universität Basel hatte die Freundlichkeit, Kontrollanalysen auszuführen, und bestimmte nach der Methode *Lieb-Zacherl* einen Gehalt von 83,6% Milchsäure.

²) *Z. physiol. Ch.* **244**, 117 (1936).

³) *Bioch. Z.* **307**, 184 (1941).

und dieses durch $1\frac{1}{2}$ Minuten langes Umschwenken extrahiert. Nach Trennung der Phasen wird die Sodalösung (unten) herauspipettiert und ins Röhrchen (2) gegeben. Diese Extraktion des Äthylacetats mit Sodalösung wird ein zweites Mal mit 4 cm^3 Sodalösung wiederholt. Nach $\frac{1}{2}$ Minute langem Extrahieren und erfolgter Phasentrennung wird diese zur ersten Portion zugefügt. Bei soda-alkalischer Reaktion ist nun alles BRS-Hydrason wieder in die wässrige Phase übergegangen, während das überschüssige Hydrazin und die andern Hydrazone im Äthylacetat zurückgeblieben sind. Zum Schluss wird der Sodaextrakt mit 1 cm^3 Äthylacetat durch mehrmaliges Umschwenken ausgewaschen und zur völligen Trennung der Phasen 1 Stunde stehen gelassen. Das überstehende Äthylacetat wird nun vorsichtig abgehebert, der Sodaextrakt in ein anderes Reagensglas übergeführt, mit 3 cm^3 3-n. NaOH versetzt und durch Schütteln gemischt. Es entwickelt sich ein roter Farbton, dessen Intensität nach 10 Minuten mit Filter S 43 (4360 \AA) photometrisch bestimmt wird. Zur Bestimmung des Leerwertes wird mit 5-proz. Trichloressigsäurelösung in gleicher Weise verfahren.

Um laufend über die Grösse des Leerwertes orientiert zu sein, empfiehlt es sich, sowohl den Leerwert als auch die Analysenlösung mit destilliertem Wasser zu vergleichen und die gesuchte Extinktion nach der Substitutionsmethode zu errechnen. Bei Verwendung von Cuvetten mit 3 cm Schichtdicke wurde mit Natriumpyruvinat „Roche“ untenstehende Standardkurve erhalten. Der Leerwert, der in erster Linie von der Qualität des verwendeten Äthylacetats abhängt, beträgt $E = 0,075$ bis $0,100$. Bei der Verwendung einer neuen Portion Äthylacetat ist jeweils eine neue Standardkurve zu erstellen. Zusätze von Glucose (25 mg/A.), Milchsäure (1 mg/A.), Trichloressigsäure (5%) zu Standardlösungen, welche $10\text{--}20\ \gamma$ BRS in 5 cm^3 Analysenlösung enthalten, haben keinen störenden Einfluss gezeigt.

Wie aus Fig. 2 zu ersehen ist, lassen sich bei dieser Versuchsanordnung BRS-Mengen von einigen γ pro cm^3 Gewebsextrakt bestimmen, dies mit einer Genauigkeit von ca. $\pm 5\%$. Da es sich bei diesen Konzentrationen nur um relativ schwache Farbintensitäten handelt, ist darauf zu achten, dass die zu photometrierende Lösung absolut klar ist.

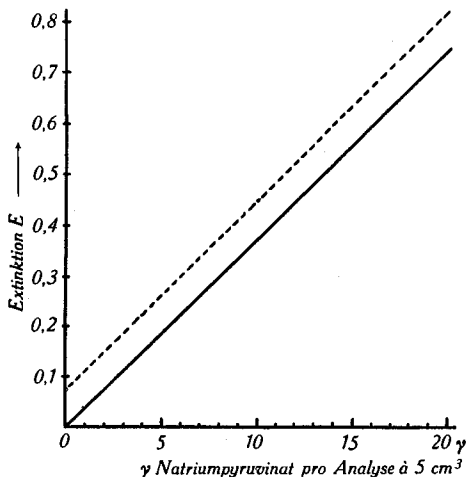


Fig. 2.

Eichkurve zur Bestimmung der Brenztraubensäure, modifiziert nach Lu. Erforderlich: 5 cm^3 Analysenlösung. Messbereich: $2\text{--}20\ \gamma$ Natriumpyruvinat, bzw. $16\ \gamma$ BRS in 5 cm^3 A. Cuvette: 3 cm . Filter S 43 (Pulfrich-Stufenphotometer) ----- = Extinktion von Leerwert und Standardlösungen, verglichen mit destilliertem Wasser. ——— = desgl. abzüglich Extinktion des Leerwertes.

Dass beim Versuch der BRS-Bestimmung in glykogenreichen Lebern ohne Vorbehandlung des Extraktes ein *Tyndall*-Effekt auftritt, ist bereits oben erwähnt worden. Andererseits ist bei der Extraktvorbehandlung von Wichtigkeit, dass alle Ca^{++} -Ionen durch die Ca^{++} -Fällung beseitigt werden, da sonst beim Laugenzusatz eine feine Trübung von CaCO_3 auftritt. Sollte dies trotzdem der Fall sein, so lässt sich das CaCO_3 durch scharfes Zentrifugieren ohne weiteres beseitigen.

5. Praktische Durchführung der Bestimmung in der Leber.

Zur Durchführung von je zwei Doppelbestimmungen Milchsäure und BRS werden mindestens 20 cm^3 ($= 4 \times 5 \text{ cm}^3$) trichloressigsäuren Extrakt benötigt. Da nach der gegebenen Vorschrift 1 g Organgewebe mit total 3-mal $2,5 = 7,5 \text{ cm}^3$ 10-proz. Trichloressigsäurelösung extrahiert wird, braucht es dazu mindestens $2,7-3,0 \text{ g}$ Gewebe. Da in unserem Falle Rattenlebern von $5-7 \text{ g}$ verarbeitet worden sind, wurde nur die Hälfte der Leber in beschriebener Weise verarbeitet und der Rest zur Bestimmung des Glykogens nach *Pflüger*¹⁾ verwendet. Von den dabei erhaltenen Resultaten, auf die an anderer Stelle noch eingegangen werden wird, sollen hier lediglich die für normale Rattenlebern gefundenen Werte wiedergegeben werden.

Tabelle 3.

Milchsäure-, Brenztraubensäure- und Glykogengehalt der Leber normaler Ratten. Abhängigkeit vom Fütterungszustand.

Nahrungskarenz	relatives Lebergew.*)	Milchsäure	Brenztraubensäure	Q $\frac{\text{BRS}}{\text{MS}}$	Glykogen*)	Anzahl Tiere
gefüttert	3,7%	52,0 mg%	2,1 mg%	4,0%	2,9%	7
24 h Hunger	3,1	26,5	1,1	4,2	0	6
48 h Hunger	2,8	26,0	1,4	5,4	0	2

*) Relatives Lebergewicht und Glykogengehalt der Leber können innerhalb einer Gruppe gleichartiger Tiere zur Beurteilung des Fütterungszustandes herangezogen werden.

6. Berechnung.

Durch Verarbeitung einer Leber von beispielsweise $4,65 \text{ g}$ erhält man nach 3-maligem Zentrifugieren und Auswaschen total $35,0 \text{ cm}^3$ trichloressigsäuren Extrakt. $4,65 \text{ g}$ Leber entsprechen $35,0 \text{ cm}^3$ Extrakt. Dieser erfährt bei der Vorbereitung zur Bestimmung eine Verdünnung von $1:1,72$. $4,65 \text{ g}$ entsprechen somit $35,0 \times 1,72 = 60,1 \text{ cm}^3$ vorbehandelten Extrakts. In 5 cm^3 dieses Extrakts wurde nun in Doppelbestimmungen ein Gehalt an Milchsäure von $0,22 \text{ mg}$ und ein Gehalt an BRS von $8,8 \gamma$ gefunden. Durch Multiplikation der gefundenen Werte mit dem Ausdruck $60,1/5,0 \times 4,65 = 2,58$ erhält man den Gehalt pro 1 g Leber, den man durch Multiplikation mit 100 auf mg% umrechnet. In diesem Falle ergeben sich folgender Werte:

Milchsäure: $0,22 \times 2,58 = 0,57 \text{ mg} = 57 \text{ mg} \%$.

Brenztraubensäure: $8,8 \times 2,58 = 22,7 \gamma \approx 2,3 \text{ mg} \%$.

Diskussion.

Von weit grösserer Bedeutung als die Wahl der Methoden selbst ist bei der Bestimmung labiler Stoffwechselzwischenprodukte, wie sie die Milchsäure und die Brenztraubensäure darstellen, die Art der Organgewinnung. Da der Gehalt der Organe (und auch des Blutes) an diesen Stoffen bei Eingriffen in den Organismus grössten Schwan-

¹⁾ Pflüger's Arch. Physiol. **114**, 242 (1906).

kungen unterliegen kann, so war es stets das Ziel der Untersucher, durch möglichst rasches Arbeiten und sofortige Fixierung des entnommenen Materials ein wahres Bild von den Stoffwechselfvorgängen zu erhalten. Es ist bekannt, dass die Milchsäure im Muskel und wohl auch in anderen Organen schon wenige Minuten nach dem Töten einen beträchtlichen Anstieg zeigt. Um den wahren Gehalt an Milchsäure *in vivo* zu erhalten, wird seit den Untersuchungen von *Embden* und *Meyerhof* (l. c.) zur Ausschaltung dieses Effektes so verfahren, dass der rasch abpräparierte Muskel in flüssige Luft geworfen und im Mörser bei Gegenwart von HCl verrieben wird. Analog sind *Lu* und *Needham*¹⁾ bei der Bestimmung der Brenztraubensäure im Muskel vorgegangen. *Davenport*²⁾ ist z. B. noch weiter gegangen und hat den Muskel am narkotisierten Tier freipräpariert, *in situ* mit CO₂-Schnee gefroren und dann entnommen. Nach den Untersuchungen des Autors selbst scheint jedoch das Narcoticum seinerseits einen Einfluss auf den Milchsäuregehalt zu haben. Es ist klar, dass ein Gefrieren der Leber oder anderer innerer Organe *in situ* beim nicht narkotisierten Tier kaum in Frage kommt. Andererseits lässt sich bei der Leber das Arbeiten mit flüssiger Luft umgehen, indem die rasch entnommene Leber nach Abkühlung und Befreiung von Blut unter dem Kaltwasserstrahl direkt mit Quarzsand und 10-proz. Trichloressigsäure verrieben wird, ohne dass die Zeitspanne, die für die erstere Methode auch benötigt würde, verlängert wird.

In bezug auf die Art der Enteiweissung ist folgendes zu bemerken. Während früher die Enteiweissung nach *Schenck*³⁾ als die einzig korrekte Methode für Organbestimmungen betrachtet wurde, verwenden heute die meisten Autoren Trichloressigsäure oder Wolfram- oder Schwefelsäure als Enteiweissungsmittel. Die Ebenbürtigkeit dieser viel einfacher zu handhabenden Methoden ist mehrfach bestätigt worden, z. B. durch *Edwards* (l. c.), *Davenport* (l. c.), *Lu* (l. c.) u. a.. Die von *Lehnartz*⁴⁾ mitgeteilte Beobachtung, dass die Trichloressigsäure auf die Milchsäurebestimmung selbst einen störenden Einfluss habe, trifft jedenfalls für die Methoden mit Cer(IV)-sulfat als Oxydationsmittel sicher nicht zu. Im weiteren sprechen die bei der fraktionierten Extraktion erhaltenen Resultate dafür, dass es dank der Feinheit der beim Verreiben mit Trichloressigsäure entstandenen Fällung rasch zu einem Konzentrationsausgleich zwischen gefällttem Eiweiss und Extraktionsflüssigkeit kommt.

Wegen der Verschiedenartigkeit der Tierart und der Methodik lassen sich direkte Vergleiche nicht ohne weiteres ziehen, doch stimmen

¹⁾ Biochem. J. **33**, 1544 (1939).

²⁾ J. Biol. Chem. **76**, 651 (1928).

³⁾ Pflüger's Arch. Physiol. **55**, 203 (1894).

⁴⁾ Z. physiol. Ch. **179**, 1 (1928).

die mit dieser Methode erhaltenen Werte mit den in der Literatur zu findenden Angaben überein. *Cori*¹⁾ bestimmte den Milchsäuregehalt von Mäuselebern (Gefriermethode) und beobachtete folgende Abhängigkeit vom Fütterungszustand: gefüttert 61 mg %, bei einer andern Serie im Mittel 51 mg %, nach 11—18 Stunden Nahrungskarenz 31 mg %, nach 17—22 Stunden Nahrungskarenz 11 mg %. *Gordon* und *Quastel* (l. c.) fanden in der Rattenleber einen Milchsäuregehalt von durchschnittlich 34,5 mg %, während *Bott*²⁾ in der Leber des gefütterten Kaninchens einen Milchsäuregehalt von 70—150 mg %, im Hungerzustand einen solchen von 20—50 mg % bestimmte. Angaben über den BRS-Gehalt der Leber konnten keine gefunden werden. Erwähnt sei noch, dass *Lu* und *Needham* (l. c.) mit der Gefriermethodik im Kaninchenmuskel 16—33 mg % Milchsäure und 0,9—1,1 mg % Brenztraubensäure fanden.

Der Quotient $Q = \text{BRS/MS}$, der bei der Rattenleber im Mittel zu 4—5 % (Schwankungen zwischen 3—6 %) gefunden wurde, beträgt nach *Lu* und *Needham* (l. c.) beim Kaninchenmuskel ebenfalls 3,3 bis 5,6 %. Die von *Stotz* und *Bessey* (l. c.) mitgeteilten Werte für den Quotienten $Q = \text{BRS/MS}$ im Blut der Ratte liegen höher (6,5—10 %), ebenso die von *Friedemann* und *Barborka* (l. c.) für Menschenblut mitgeteilten Werte ($Q = 7—9\%$ = Ruhewert!). Ob es sich beim Grössenunterschied des Quotienten zwischen Blut und Geweben um einen systematischen Unterschied handelt, lässt sich auf Grund der bisherigen Resultate noch nicht feststellen.

Die vorliegenden Methoden liefern die Unterlagen für das weitere Studium der Probleme des intermediären Kohlehydratstoffwechsels, insbesondere derjenigen der Milchsäure und Brenztraubensäure in der Leber.

Zusammenfassung.

1. Es wird ein Mikroverfahren zur Bestimmung von Milchsäure und Brenztraubensäure in der Leber beschrieben.

2. Die durch erschöpfende Extraktion der Trichloressigsäurefällung der Leber gewonnene Extraktionsflüssigkeit wird zwecks Entfernung der in relativ grossem Masse vorhandenen Begleitstoffe (Glykogen) mit Hilfe eines abgeänderten Kupfer-Kalkfällungsverfahrens vorbehandelt.

3. Die Bestimmungsmethode für Milchsäure wurde von *Long* (Oxydation der M.S. mit Cer(IV)-sulfat), diejenige für Brenztraubensäure von *Lu* (Überführung der BRS in ihr 2,4-Dinitrophenylhydrazon) in modifizierter Form übernommen.

¹⁾ J. Biol. Chem. **63**, 253 (1925).

²⁾ J. Biol. Chem. **109**, 463 (1935).

4. Der Gehalt der Leber an Milchsäure (Ratte) ist vom Fütterungszustand stark abhängig und beträgt bei normalen Ratten 40—60 mg % in gefüttertem Zustand, bzw. 20—35 mg % nach 24 Stunden Hunger. Der Gehalt an BRS beträgt 1,5—3,0 mg % gefüttert und 0,8—1,4 mg % nach 24 Stunden Hunger. Der Quotient $Q = \text{BRS/MS}$, der vom Fütterungszustand nur wenig abhängig zu sein scheint, beträgt im Mittel 4%.

Herrn Prof. *I. Abelin*, der mich zur Ausführung dieser Untersuchungen angeregt hat und unter dessen Leitung die Arbeit entstanden ist, möchte ich für seine Ratschläge und sein Wohlwollen hiermit herzlich danken.

Bern, Medizinisch-chemisches Institut der Universität,
Juli 1947.

202. Naphtalinderivate II¹⁾.

Über die Einwirkung von Säurechloriden auf Naphtsulton nach *Friedel-Crafts*²⁾

von Guido Schetty.

(26. VII. 47.)

Durch direktes Substituieren von 1,8-Naphtsulton sind bis jetzt 4-Chlor-naphtsulton³⁾, 4-Brom-naphtsulton³⁾⁴⁾, Naphtsulton-4-sulfonsäure⁵⁾ und Naphtsulton-4-sulfochlorid⁶⁾ dargestellt worden. Im Zusammenhang mit unseren Arbeiten über Farbstoffzwischenprodukte aus der Naphtalinreihe haben wir uns gefragt, ob das Naphtsulton nach der *Friedel-Crafts*'schen Reaktion substituiert werden könne. Eine allfällige Reaktionsfähigkeit erschien uns auch theoretisch von Bedeutung: damit würde doch erstmals ein durch eine cyclische Sulfonyl-estergruppe besetzter Aromat nach *Friedel-Crafts* kondensiert.

Arylsulfonsäure-arylester erleiden durch die Einwirkung von Aluminiumchlorid bei erhöhter Temperatur eine der *Fries*'schen Verschiebung analoge Umlagerung zu Oxy-sulfonen⁷⁾. Daher lassen sich Arylsulfonsäure-1-naphtolester mit Säurechloriden bei Gegenwart von Aluminiumchlorid nur unter Bildung von undefinierbaren harzi-

¹⁾ Naphtalinderivate I, *A. Krebs* und *F. Vannotti*, *Helv.* **21**, 1221 (1938).

²⁾ Der Inhalt der vorliegenden Veröffentlichung ist Gegenstand von S. P. 236 226, F. P. 898 817 und A. P. 2 359 730.

³⁾ D.R.P. 430 551; *Frld.* **15**, 321.

⁴⁾ *G. Heller*, *Z. angew. Ch.* **41**, 171, 174 (1928).

⁵⁾ *A. Bernthsen*, *B.* **23**, 3091 (1890); *Badische Anilin- und Sodafabrik*, D.R.P. 57 388; *Frld.* **2**, 260, 563.

⁶⁾ *Kalle & Co.*, D.R.P. 343 056; *Frld.* **13**, 1108.

⁷⁾ *Chemische Fabrik von Heyden*, D.R.P. 532 403; *Frld.* **18**, 517.