Die Energieumwandlungen im Muskel.

VI. Mitteilung.

Über den Ursprung der Kontraktionswärme¹⁾.

Von

Otto Meyerhof.

(Aus dem Physiologischen Institut der Universität Kiel.)

Mit 5 Textabbildungen.

(Eingegangen am 18. Februar 1922.)

Inhalt:

Einleitung (S. 22)

Kap. I. Bestimmung der Verbrennungswärme der Milchsäure (S. 24).

Kap. II. Der kalorische Quotient der Milchsäure (S. 26).

a) Der kalorische Quotient im gereizten Muskel (S. 28).

b) Der kalorische Quotient in der zerschnittenen Muskulatur (S. 32).

c) Wärme- und Milchsäurebildung im ruhenden Muskel (S. 40).

Kap. III. Über Wärmebildung beim Eindringen von Säure in den Muskel (S. 44).

Kap. IV. Über die Dissoziationswärme des Eiweißes (S. 49).

a) Neutralisationswärme der Milchsäure in anorganischer Lösung (S. 49).

b) Neutralisationswärme der Milchsäure in eiweißhaltigen Flüssigkeiten (S. 52).

c) Die Dissoziationswärme der Aminosäuren (S. 53).

d) Die Neutralisation der Milchsäure durch isoliertes Eiweiß (S. 57).

Kap. V. Bemerkungen zu den chemischen Vorgängen bei der Kontraktion (S. 64).

a) Keine Bildung anaerober Kohlensäure (S. 64).

b) Kein meßbares anaerobes Verschwinden von Milchsäure (S. 65).

c) Über die mutmaßliche Stellung der Eiweißionisierung im Kontraktionsvorgang (S. 67).

d) Betrachtungen zum gesamten Kontraktionszyklus (S. 71).

Zusammenfassung (S. 72).

Einleitung.

Wenn der Muskel unter anaeroben Bedingungen Arbeit leistet, so schwinden Kohlenhydrate, ganz vorwiegend das Glykogen, und es tritt eine äquivalente Menge Milchsäure auf. Prinzipiell der gleiche Vorgang spielt sich auch dann ab, wenn der Muskel durch Temperaturerhöhung oder chemische Substanzen in Starre versetzt wird und schließlich auch, wenn wir dem Muskel ohne jede Reizung bei niedriger Temperatur den

¹⁾ Die Arbeit wurde mit Unterstützung der Jagorstiftung ausgeführt, der auch hier für die geleistete Hilfe gedankt sei.

Sauerstoff entziehen; nur verläuft dieser Vorgang dann erheblich langsamer. Die allgemeine Gleichung dieser anaeroben Stoffwechselphase lautet einfach $\frac{1}{n} (C_6H_{10}O_5)_n + H_2O = 2 C_3H_6O_3$; gleichzeitig treten hierbei pro 1 g Milchsäure gegen 400 cal. auf, wobei wir vorläufig von den früher beobachteten Schwankungen absehen. Die Verbrennungswärme des Glykogens ist in einer Reihe von Versuchen von *Stohmann*¹⁾ für 1 g Glykogen zu 4191 cal., also für 0,9 g entsprechend 1 g Glucose zu 3772 cal. bestimmt. Die Verbrennungswärme der Milchsäure ist bisher noch niemals experimentell bestimmt worden. Dies ist nur von *Louguinine* für den Äthylester geschehen und hieraus ist lediglich rechnerisch die Verbrennungswärme zu 3661 cal. pro 1 g gefunden worden²⁾. Die Differenz beider Werte ist 111 cal. Wir finden aber für diese Reaktion 400 cal. Das hierin gelegene Problem wird in der folgenden Arbeit behandelt, wobei sowohl die angeführten Zahlen auf ihre Richtigkeit experimentell geprüft als auch die Ursache für die Abweichung der thermochemischen und in der Muskulatur ermittelten Wärmewerte aufzuhellen versucht wird. Beides gelingt in erheblichem Umfange.

Von verschiedenen Autoren ist darauf hingewiesen, daß der hier betrachtete Vorgang nicht der einzige zu sein braucht, der sich bei der Anaerobiose des Muskels abspielt, und unsere ausschließliche auf die Kohlenhydrat- und Milchsäurebilanz gegründete energetische Überlegung ist einer gewissen Einseitigkeit geziehen worden. Es ist nun scharf zu unterscheiden, ob etwaige sonstige Vorgänge im Endresultat zur Geltung kommen oder nicht. Z. B. die von *Emden* angenommene Abspaltung anorganischer Phosphorsäure³⁾ aus Hexosephosphorsäure bei der Kontraktion kommt im Endresultat nicht vor. Denn wie ich schon wiederholt hervorhob, schwindet ja in der Anaerobiose beim Auftreten der Milchsäure das Glykogen selbst und es kann bei weitgehender Ermüdung eine viel größere Menge Milchsäure entstehen als überhaupt Phosphorsäureester vorhanden ist. Mithin muß sich bereits anaerob die freigemachte Phosphorsäure mit neu zersetztem Glykogen wieder synthetisieren und dementsprechend ist auch kurze Zeit nach Ablauf der Kontraktion der Gehalt an anorganischem Phosphat nicht vermehrt⁴⁾. Behalten wir die Äquivalenz von Glykogen und Milchsäure im Auge, so könnte ein anderer für die Bilanz in Betracht kommender und uns bisher entgangener Vorgang nur ein solcher sein, der vom Kohlenhydratstoffwechsel unabhängig ist. Hierbei müßte eine beträchtliche Stoffmenge umgesetzt werden, um die erforderliche Größen-

¹⁾ Journ. f. prakt. Chem. (2) **50**, 385. 1894; vgl. *Landolt-Börnstein*, 4. Aufl., S. 922.

²⁾ Cpt. rend. **101** (2), 1154. 1885.

³⁾ *Emden* und *Lavaczek*, Klin. Wochenschr. **1**, Nr. 1, S. 23. 1922.

⁴⁾ Siehe *Parnas* und *Wagner*, Biochem. Zeitschr. **61**. 1914 und *Laquer*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **93**, 1914/1915.

ordnung zu erreichen, und dies um so mehr, je geringfügiger die Verschiebung des Atomgefüges bei dieser Umsetzung und entsprechend die molekulare Wärmetönung der Reaktion sein würde. Von *Winfield* unter Leitung von *Hopkins* ist festgestellt worden, daß keinerlei Schwinden von Fett¹⁾, von *Parnas* und *Wagner*²⁾, daß keine Zersetzung von Eiweiß zu konstatieren ist. Nur ein sehr weitgehender anaerober Molekülzerfall könnte bei verhältnismäßig kleinen Substanzmengen ein in Betracht kommendes Resultat bewirken. Aus diesem Grunde ist im folgenden noch einmal die etwaige *Bildung* anaerober Kohlensäure (nicht Austreibung!) geprüft worden, da sie im intakten Froschmuskel bisher noch nicht sicher ausgeschlossen worden ist. Abgesehen davon, daß es leicht gelingt, sie tatsächlich auszuschließen, werden sich überhaupt Resultate ergeben, die es als außerordentlich unwahrscheinlich erscheinen lassen, daß noch andere chemische Prozesse als der hier allein in Betracht gezogene auf die energetische Bilanz von Einfluß sind.

Kapitel I. Bestimmung der Verbrennungswärme der Milchsäure.

Das wichtigste Postulat war zunächst die Verbrennungswärme der Milchsäure neu zu bestimmen, da das *Louguininesche* Verfahren der Berechnung per analogiam unbefriedigend erscheint, abgesehen von den möglichen Fehlern bei der Bestimmung der Verbrennungswärme des Äthylesters. Ich unterzog mich dieser ziemlich langwierigen Aufgabe und habe die Ausführung der Messungen an einem anderen Ort beschrieben³⁾, so daß hier nur die gefundenen Resultate mitzuteilen sind. Eine direkte Verbrennung der freien Milchsäure ist allerdings nicht möglich. *Krafft* und *Dyes*⁴⁾ ist es zwar gelungen, reine krystallisierte Milchsäure darzustellen. Diese erwies sich jedoch als schlecht haltbar und enorm hygroskopisch; die durch Destillation wasserfrei gemachte Säure wandelte sich schon vor völliger Trocknung teilweise in das Anhydrid um. Dagegen ist das krystallisierte milchsaure Zink in hoher Reinheit im Handel zu haben. Ich benutzte das völlig analysenreine aus heißem Wasser umkrystallisierte Salz $\text{Zn}(\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_3)_2 + 3 \text{H}_2\text{O}$, das vor Gebrauch durch Erhitzen auf 110° von Krystallwasser befreit wurde. Es gelang mit einigen Kunstgriffen dieses in der *Berthelotschen* Bombe glatt zu verbrennen; alle nötigen Umsatzwärmen wurden in Dewargefäßen bestimmt. Die Bestimmungsmethode ist mithin indirekt, aber doch vollständig experimentell und unterscheidet sich somit von der von *Louguinine* angewandten. Folgende Reaktionswärmen wurden bestimmt:

¹⁾ Journ. of physiol. **49**, 171. 1915.

²⁾ Biochem. Zeitschr. **61**, 416. 1914.

³⁾ Biochem. Zeitschr. **129**, 594. 1922, erscheint gleichzeitig.

⁴⁾ Ber. d. chem. Ges. **28**, 2589. 1895.

- I. $\text{Zn}(\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_3)_2 (\text{fest}) + 6 \text{O}_2 = \text{ZnO} (\text{fest}) + 6 \text{CO}_2 (\text{gasf.}) + 5 \text{H}_2\text{O} (\text{flüss.}).$
 II. $2 \text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3 (\text{conc.}) + \text{aq.} = 2 \text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3 \text{ aq.}$
 III. $2 \text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3 \text{ aq.} + \text{Zn O} (\text{fest}) = \text{Zn} (\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_3)_2 \text{ aq.} + \text{H}_2\text{O} (\text{flüssig}).$
 IV. $\text{Zn}(\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_3)_2 \text{ aq.} + 2 \text{HCl aq.} = \text{ZnCl}_2 \text{ aq.} + 2 \text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3 \text{ aq.}$
 V. $\text{Zn}(\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_3)_2 (\text{fest}) + 2 \text{HCl aq.} = \text{ZnCl}_2 \text{ aq.} + 2 \text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3 \text{ aq.}$

Bei Addition der 4 ersten Gleichungen und Subtraktion von V fallen alle Größen heraus außer den fettgedruckten und wir erhalten als Resultat

Im einzelnen ist dazu zu bemerken, daß an Stelle der Gleichungen IV und V prinzipiell auch die direkte Lösung des festen Zinklactats in Wasser hätte gewählt werden können, der Umweg ist durch die Schwerlöslichkeit des Zinklactats geboten. Ferner ist Gleichung II für die späteren Überlegungen nicht unbedingt nötig, da uns nur die Verbrennungswärme der verdünnten Säure interessiert. Auch konnte die Verdünnungswärme nur für die 70 proz. käufliche anhydridhaltige Säure bestimmt werden. Nur zum Vergleich mit den Resultaten *Louguinines* und mit den sonst auf reine Substanzen bezogenen Verbrennungswärmen wäre die genauere Kenntnis der Verdünnungswärme erforderlich.

Für Gleichung I ergab sich pro 1 g wasserfreies Zinklactat in 4 Verbrennungen 2596, 2601, 2595, 2596 cal., im Durchschnitt 2597 cal. oder pro 1 Mol (Molekulargewicht 243,54) 632 540 cal. Für Gleichung II ergab sich bei 110facher Verdünnung der käuflichen 74 volumenproz. Säure pro 1 g reine Milchsäure 14,2 und 14,0 cal.; die 35 proz. Säure bei ähnlicher Verdünnung ergab pro 1 g 9,2 cal., die 17 proz. 5,75 cal. Man kann für die 100 proz. Säure vielleicht den Wert 18,5 cal. extrapolieren, doch wird nur der experimentell bestimmte Wert der Verdünnungswärme der 74 proz. Säure berechnet, dieser gibt für 2 Mol entsprechend Gleichung II 2520 cal. Für Gleichung III ergab sich in 5 Bestimmungen pro 1 g festes geglühtes Zinkoxyd 289, 291, 282, 279, 283 cal., Durchschnitt 285 cal. oder pro 1 Mol 23 180. Für Gleichung IV ergab sich nach Abzug der Verdünnungswärme der Salzsäure keine meßbare Wärmetönung (im Mittel von 3 Versuchen für 2 Millimol HCl etwa $-0,1$ cal. oder pro 1 Mol Zinklactat -100 cal. Der Wert liegt in der Fehlergrenze). Für Gleichung V ergab sich in 4 Bestimmungen für 1 g wasserfreies Zinklactat 28,8, 29,7, 25,8, 26,6, im Durchschnitt 27,4 oder pro 1 Mol 6800. Da die Gleichung in umgekehrter Richtung geschrieben oder abgezogen werden muß, entsprechend der Ausfällung des Zinklactats also -6800 cal.

Als Summe der 5 Gleichungen ergibt sich pro 2 Mol $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3$:

I	+	632 540
II	+	2 520
III	+	23 180
IV		0
V	—	6 800
<hr/> Sa.		<hr/> 651 440

pro 1 Mol Milchsäure also 325 720 cal. oder pro 1 g 3615 cal., unter Weglassung von Gleichung II die Verbrennungswärme der verdünnten Säure: 3601 cal. Der so ermittelte Wert der Verbrennungswärme mag zunächst als vorläufig und auf $\pm 0,3\%$ genau angesehen werden. Eine gewisse Korrektur erfährt er vielleicht durch die nach Verabredung im Institut von Herrn Prof. Roth (Braunschweig) gleichzeitig ausgeführten Bestimmungen, die auf verschiedenen Wegen das gleiche Ziel erstreben. Die Differenz der Verbrennungswärme des Glykogens und der Milchsäure (konz.) beträgt somit nicht wie bisher nach der Zahl von *Louguinine* berechnet wurde, 110 cal., sondern 157 cal., bzw. für verdünnte Säure 171 cal. Vielleicht ergibt aber die von *Louguinine* durch Analogie berechnete Zahl die Verbrennungswärme krystallisierter wasserfreier Säure, dies könnte den Unterschied wenigstens zu einem Teil erklären.

Kapitel II. Der kalorische Quotient der Milchsäure.

Methodik der Milchsäurebestimmung. Diese entsprach der früher angewandten. Abgesehen von den wenigen Fällen, in denen Zucker zum Muskel zugesetzt wurde, ließ sich die Milchsäure ohne vorangehende Amylalkoholextraktion bestimmen. Wiederholte Kontrollen ergaben immer wieder, daß bei Einhaltung der früher angegebenen Vorschriften so ein mindestens so genaues Resultat erzielt wird wie mit Extraktion. Bei wiederholten Kontrollbestimmungen unter den hier benutzten Konzentrationsbedingungen wurde sowohl mit umkrystallisierten milchsaurem Zink, wie auch mit dem bisher benutzten milchsauren Lithium, bei der Destillation ein durchschnittlicher Verlust von 8% erhalten, wie sich aus der nachfolgenden Übersicht ergibt (vgl. dazu auch Tab. I, Energieumwandlungen I, Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. 182, 236). Alle für die Destillation und Titration verwandten Lösungen werden mit doppeldestilliertem Wasser hergestellt. Der Gesamtverlust bei der Routinemethode in der jetzigen Ausführung wird, wie in der letzten Arbeit,

Tabelle I.

Nr.	Salz	Benutzte Menge		Jod cem	Titer n_{100} Jod	Auf 1 cem n_{20} Milchsäure ¹⁾	
		Salz mg	$\frac{1}{1000}$ mol. Milchsäure			n_{100} Jod	Verlust %
1	Li	4,95	0,0515	9,55	1,00	9,27	7,3
2	Li	4,95	0,0515	9,4	1,00	9,13	8,7
3	Zn	8,1	0,0543	10,1	1,00	9,28	7,2
4	Zn	8,1	0,0543	10,0	1,00	9,18	8,2
5	Zn	7,85	0,0528	9,3	1,03	9,16	8,4
6 ²⁾	Zn	7,85	0,0528	9,5	1,02	9,28	7,2
7 ²⁾	Zn	7,85	0,0528	9,5	1,02	9,28	7,2
8 ²⁾	Zn	7,40	0,050	8,85	1,025	9,05	9,5
Durchschnitt							8,0

¹⁾ Theoretisch 10,0 cem n_{100} -Jod.

²⁾ Nach *Schenk* verarbeitet.

im Durchschnitt zu 16%, der Umrechnungsfaktor zu 1,19 berechnet. Demgegenüber müssen die Zahlen der Arbeit I, soweit sie im folgenden Verwendung finden, um durchschnittlich 3—4% vergrößert werden, weil das Zurückbleiben einer gewissen Milchsäuremenge von etwa diesem Umfang in der Muskulatur damals bei der Ausrechnung nicht berücksichtigt war. Diese Korrektur ist im folgenden angebracht worden. Der Verlust von 16% bei der Routinemethode kommt zu etwa gleichen Teilen (je 8%) erstens auf Verluste bei der Verarbeitung a) Zurückbleiben von Milchsäure in der Muskulatur, b) Verluste beim Eindampfen des Alkohols und Filtration des mit Ammonsulfatlösung verriebenen Rückstandes, zweitens auf die Aldedydbestimmung. Infolge dieser Aufteilung sind die Verluste recht gleichmäßig, so daß die Doppelbestimmungen meist innerhalb 4—5% übereinstimmen. Diese Doppelbestimmungen wurden bei den meisten wichtigeren Versuchen, so den Wärmeversuchen des vorliegenden Kapitels, ausgeführt. Falls dabei Abweichungen von mehr als 6—8% vorkamen, wurde eine dritte Bestimmunggeschlossen, durch die stets eine der beiden ersten als fehlerhaft eliminiert werden konnte. Der Fehler ist dabei in den meisten Fällen eine zu weit gehende Eindampfung des alkoholischen Extraktes¹⁾. Um ein Urteil über die Genauigkeit zu ermöglichen, habe ich als Beispiel in den späteren Tabellen für die Milchsäureendwerte der Wärmeversuche die titrierten cem Jod (unkorrigiert) angegeben, und die Resultate der Doppelbestimmungen hierbei. Bei den andern Serien sind aus Raumersparnis die Titrationswerte nicht mit angegeben; sie ergaben dasselbe Bild.

Die *Ringersche* Lösung wurde nach *Schenk* verarbeitet. Auch hier konnte die Milchsäure fehlerlos unter Weglassung der Amylalkoholextraktion direkt bestimmt werden; doch wurde nur je $\frac{1}{2}$ oder $\frac{1}{4}$ soviel 2proz. Salzsäure und 5proz. Sublimat benutzt, wie Ringerlösung. Die zur Bestimmung benötigte Menge des Schenkefiltrats wurde, nachdem sie durch Schwefelwasserstoff entquecksilbert und durch Luftstrom von Schwefelwasserstoff befreit war, zunächst unter teilweiser Neutralisierung mit Natronlauge auf dem Wasserbad auf etwa 10—15 cem eingedampft, dann mit Soda vollständig neutralisiert und die Lösung, etwa 15 cem, unter Nachspülen von 0,5proz. Schwefelsäure in den Claisenkolben übergespült und mit 0,5proz. Schwefelsäure auf 30—35 cem aufgefüllt. Bei unmittelbarer Verwendung der salzsauren Lösung fällt die Bestimmung weniger genau aus.

Bei den Versuchen mit zerschnittener Muskulatur liegt es nahe, das ganze Material inklusive die Muskeln als Schenkefiltrat zu verarbeiten und einen aliquoten Teil zur Milchsäurebestimmung zu verwenden. Diese Methode ist in einer kürzlich veröffentlichten Arbeit von *Laquer*²⁾ angewandt worden, der an diese Verarbeitung die Ätherextraktion anschloß. Voraussetzung für die Brauchbarkeit dieses Verfahrens ist, daß die Milchsäure sich nach Zusatz von Salzsäure und Sublimat bei 12stündigem Stehen völlig gleichmäßig auf den Niederschlag und die überstehende Lösung verteilt. Ob dies bei größeren Mengen Muskulatur der Fall ist, erscheint fraglich, doch ergaben sich mir bei verhältnismäßig kleinen Muskelmengen in

¹⁾ Prinzipiell kann die Verarbeitung verlustlos geschehen, doch ist dieses sehr zeitraubend und erfordert besondere Aufmerksamkeit, so daß es bei sehr zahlreichen Bestimmungen sich nicht immer durchführen läßt. Es ist deshalb zweifellos einwandfreier, möglichst gleichmäßig nach einem Routineverfahren zu arbeiten, und es ist selbstverständlich, daß der Umrechnungsfaktor nur für den Vergleich der Milchsäurebestimmungen mit anderen Größen benötigt wird, während sie unter sich direkt verglichen werden können. Wenn Autoren, die lediglich Milchsäurebestimmungen ausführen, dabei auf Umrechnungen verzichten, so folgt daraus natürlich nicht, daß ihre Bestimmungen genauer sind wie die hier mitgeteilten.

²⁾ Zeitschr. f. physiol. Chem. **116**, 169. 1921.

einigen Doppelbestimmungen mit Alkoholextraktion und Schenkverarbeitung gut übereinstimmende Werte, wenn als Umrechnungsfaktor für die erstere 1,19, für die letztere 1,10 benutzt wurde. Siehe die folgenden Beispiele, Tab. II. Der

Tabelle II.

Verarbeitung aliquoter Mengen zerschnittener Muskulatur mit Alkoholextraktion (A) und als Schenkfiltrat (B).

Nr.	Muskelmenge pro Versuch	A				S			
		Alkohol extrakt ccm	verarb. ccm	$\frac{n}{100}$ Jod ccm	Milchsäure im ganzen (korr. + 19%)	Schenkflüssigkeit im ganzen ccm	verarb. ccm	$\frac{n}{100}$ Jod ccm	Milchsäure im ganzen (korr. + 10%)
1.	2,5 g in 8 ccm Phosphatlösung	20	10 10	12,8 12,5	13,55	30	10 10	9,15 8,9	13,4
2.	1,4 g in 7 ccm NaCl-Lösung	20	10	3,8	4,1	25	10	3,35	4,15

Umrechnungsfaktor muß hier ungefähr derselbe sein, wie bei unmittelbarer Bestimmung der Milchsäure nach *Fürth-Charnass*, weil an Stelle der Auslaugung der Muskelsubstanz ein aliquoter Teil der Lösung zur Verarbeitung kommt. Doch glaube ich nicht, daß diese Bestimmungen viel genauer sind als nach der von mir benutzten Methodik; denn die Unsicherheit liegt hier darin, ob eine vollständig gleichmäßige Verteilung der Milchsäure zwischen der Volumeneinheit Muskelsubstanz und Lösung stattfindet. Ich selbst habe diese Verarbeitung der zerschnittenen Muskulatur als Schenkfiltrat im Hinblick auf die inzwischen erschienene Publikation von *Laquer* probeweise in mehreren Fällen am Schluß dieser Arbeit vorgenommen, doch wurde es mir infolge einzelner Fehlschläge zweifelhaft, ob nicht — speziell bei länger dauernden Destillationen — der hohe Cl-Gehalt der Lösung zu Fehlern bei der Aldedydbestimmung führen kann (Übergang von HCl in die Vorlage), so daß dies Verfahren nur in Verbindung mit Extraktion der Milchsäure zuverlässig erscheint. Ich sah somit keine Veranlassung, von dem sonst benutzten Verfahren abzugehen. Die Methodik der Wärmeversuche ist, soweit sie von den früher benutzten abwich, bei den einzelnen Kapiteln angegeben.

a) *Der calorische Quotient im gereizten Muskel.*

In der ersten Arbeit dieser Serie sind bereits zahlreiche, im ganzen 32 vollständige Versuche mitgeteilt, in denen gleichzeitig die anaerob gebildete Milchsäure und die dabei aufgetretene Wärme gemessen und daraus der calorische Quotient der Milchsäure $\frac{\text{g cal.}}{\text{g Milchsäure}}$ berechnet wurde. Dies geschah bei der Chloroformstarre (6 Versuche), bei Ermüdung durch elektrische Reizung bei verschiedenen Temperaturen (Tetanus 7,5° 2 Versuche, 14° 9 Versuche, 22° 6 Versuche, Einzelschläge

14° 5 Versuche) und für die Ruheanaerobiose von enthäuteten Froschschenkeln bei 22° (4 Versuche). Die Übereinstimmung innerhalb der einzelnen Serien war in Anbetracht der Schwierigkeit der Messung im ganzen befriedigend. Gewisse Abweichungen ergaben dagegen die Mittel der verschiedenen Serien. Doch war nur in einem Fall diese Abweichung so groß und die Zahlen innerhalb der Serie so gut übereinstimmend, daß mit einer hohen Wahrscheinlichkeit auf einen außerhalb der Fehlergrenze gelegenen systematischen Unterschied geschlossen werden konnte, nämlich bei der Ruheanaerobiose. Das Resultat von 4 Versuchen ergab hier 260, 273, 310, 278 cal., im Durchschnitt 280 cal., während bei derselben Temperatur der calorische Quotient der tetanischen Ermüdung im Durchschnitt 390 cal. (340—450 cal.) betrug. Sonst ergaben nur noch die Chloroformstarreversuche ein unter sich recht gut übereinstimmendes Resultat von 340 cal. (6 Bestimmungen bei 3 Temperaturen, 14° 360, 346, 22° 350, 338, 27° 290, 350 cal.), das von *einer* Bestimmung abgesehen innerhalb 8% konstant war. Ob bei den Reizungsversuchen die Änderung der Mittelwerte mit der Temperatur einen objektiven Grund hatte, mußte dahingestellt bleiben, da sich herausstellte, daß bei vom Thermostaten stark abweichender Zimmertemperatur die Korrekturberechnung für den Wärmeausgleich leicht ungenau wird, und gerade diejenigen Versuche, bei denen die Zimmertemperatur mit der Thermostatentemperatur fast übereinstimmte, hatten innerhalb der verschiedenen Serien einen sehr ähnlichen calorischen Quotienten ergeben. Dieser Punkt wurde daher neuerdings kontrolliert, zumal früher mit Einzelinduktionsschlägen bei 14° ein kleinerer Mittelwert wie bei der tetanischen Reizung erzielt war, der wahrscheinlich zufällig war. Es erschien richtig, für die Berechnung der Mittelwerte diejenigen von den früheren Versuchen mitzubenutzen, die bei einer mit der Thermostatentemperatur übereinstimmenden Zimmertemperatur ausgeführt waren, dagegen die im heißen Hochsommer 1919 bei einer Thermostatentemperatur von 14° angestellten, und auch die Messungen bei 7° zu vernachlässigen und ferner einen nicht ganz zuverlässigen Versuch (wegen zu hoher Anfangsmilchsäure) mit Einzelreizung fortzulassen (Tabelle XIV, Versuch 3—8, S. 266 und Versuch 21). Eine teilweise Wiederholung erschien auch infolge der inzwischen erzielten Vereinfachungen der Milchsäurebestimmung erwünscht. Tatsächlich ergab sich so, wie die folgenden Tabellen III und IV zeigen, kein Anlaß, für die Reizungsversuche unter verschiedenen Umständen (Einzelzuckungen oder Tetani, 14° oder 22°) einen verschiedenen kalorischen Quotienten anzunehmen. Unglücklicherweise sind die neuen Versuche bei 14° kaum als genauer zu betrachten wie die früheren, da die diesmal verwandten Frösche im Spätherbst die Neigung zeigten, selbst nach 1—2stündigem Aufenthalt in

Eiswasser im Gefolge der Nervendurchtrennung in eine vorübergehende tonische Starre zu verfallen, die zu einer Milchsäureproduktion von etwa 0,04% mit einer Unsicherheit von $\pm 0,015\%$ Anlaß gab.

Die Ausführung der Wärmeversuche war gegen die frühere Arbeit im allgemeinen unverändert, nur wurde Sorge getragen, daß die Zimmertemperatur innerhalb $1-2^\circ$ mit der Thermostatentemperatur übereinstimmte. Die Froschschenkel wurden nicht abgehäutet, doch wurden die Füße in den Sprunggelenken abgeschnitten. Es wurde bei einem Rollenabstand von 18—13 cm mit *einem* Akkumulator mittels um die Beckenknochen gewundenen dünnen Kupferdrähten gereizt, niemals bis zur völligen Ermüdung, um die Bildung von meßbarer *Joulescher* Wärme durch zu starke Ströme zu vermeiden. Die Versuche wurden mit dem gleichen Calorimetergefäß wie früher ausgeführt (Wasserwert des Dewarkolben mit Reizanordnung und Thermometer = 20). In der Tabelle III sind die neuen Versuche zusammengestellt: Einzelreizung bei 22° , Tetanus bei 21° und 22° , Tetanus bei 14° . Für die meist 1 Stunde 40 Minuten betragende Vorperiode, die dem vollständigen Temperatúrausgleich dient, ist auf Grund der Versuche über die anaerobe Ruhewärme die der benutzten Muskelmenge entsprechende Calorienproduktion in Tabelle III A, vorletzte Spalte, ausgerechnet; andererseits ist in III B, vorletzte Spalte, der Milchsäureanfangsgehalt auf Grund zahlreicher Kontrollversuche in Abzug gebracht. Wo keine besondere Komplikation durch Tötungskrämpfe usw. vorliegt, darf dieser Wert auf $\pm 0,005\%$ genau angesehen werden; bei solchen Komplikationen (Versuch 6—8) aber nur auf $\pm 0,015\%$.

Tabelle III.

Neue Versuche zur Wärme- und Milchsäurebildung bei elektrischer Reizung.

A. Wärmeversuche.

Nr.	Datum 1921	Temp. Grad	Reizart und Dauer ¹⁾	Vers.- Zeit in Min.	Musk. in g	Gesamt- wasser- erw.	Korr. Temp.- Anstieg Grad	Cal.	Cal. für An- fangs- zeit	Cal. pro 1 g Muskel
1	10. IX.	22,5	E 12' 40 pro 1'	40	24,9	221	0,1015	21,8	2,5	0,975
2	22. IX.	22,5	E 17' 50 pro 1'	40	22,6	219,5	0,0935	20,5	2,3	1,007
3	29. IX.	22,5	E 12' 50 pro 1'	35	26,9	222	0,0645	14,3	2,7	0,632
4	24. IX.	22,5	T 17'	40	22,2	215	0,075	16,1	2,0	0,815
5	17. XI.	21	T 9'	32	22,2	207	0,0565	11,7	2,2	0,627
6	25. XI.	14	T 11'	40	20,8	203	0,0625	12,7	0,8	0,65
7	26. XI.	14	T 8'	30	22,6	213	0,048	10,3	1,1	0,505
8	5. XII.	14	T 15'	45	22,4	217	0,0515	11,2	0,8	0,535

¹⁾ T = Tetanus, E = Einzelreize.

B. Milchsäureversuche.

Nr.	Verarb. Musk. in g	Aliquoter Teil bestimmt ccm	Jod unkorr. ccm	Milchs. in Muskul- menge des Wärmevers. mg	Ringerlösung			Milchs. im ganzen %	Milchs. für Anfang %	c. Q.
					pro Be- stimm. ccm	Jod unkorr. ccm	Milchs. mg			
1	19,9	5 : 50	10,1	52,5	—	—	2,0	0,274	0,015	377
		5 : 50	9,5							
2	18,9	5 : 50	10,5	58,7	33,5	0,95	2,4	0,322	0,015	349
		5 : 50	11,2							
3	24,5	10 : 50	19,8	58,7	—	—	2,0	0,226	0,015	300
		5 : 50	10,2							
4	20,7	5 : 50	7,65	43,9	33,5	1,05	2,8	0,210	0,015	418
		5 : 50	7,5							
5	20,0	10 : 50	13,6	41,4	33,5	0,95	2,2	0,197	0,015	344
		10 : 50	13,9							
6	19,0	10 : 50	15,4	45,6	33,5	1,15	2,6	0,232	0,04	339
		10 : 50	15,55							
7	20,4	10 : 50	12,4	37,0	33,5	0,7	1,7	0,171	0,04	385
		10 : 50	12,25							
8	20,8	10 : 50	13,55	38,7	33,5	0,8	2,0	0,182	0,04	377
		10 : 50	13,7							

Tabelle IV.

Übersicht über die unter vergleichbaren äußeren Bedingungen ausgeführten Reizungsversuche (ältere Zahlen korrigiert).

Früh. Nr.	Datum	Temperatur Grad	Reizart	Milchsäure %	c. Q.	Durch- schnitt
12	24. V. 1919	22	Tet.	0,223	393	377
13	28. V. 1919	22	„	0,239	330	
14	31. V. 1919	22	„	0,185	352	
15	14. VI. 1919	22	„	0,218	373	
16	7. II. 1920	20,5	„	0,157	438	
17	2. II. 1920	20,5	„	0,175	375	
1	10. IX. 1921	22,5	Einzelr.	0,274	377	357
2	22. IX. 1921	22,5	„	0,322	349	
3	29. IX. 1921	22,5	„	0,226	300	
4	24. IX. 1921	22,5	Tet.	0,210	418	
5	17. XI. 1921	21	„	0,197	344	
9	11. X. 1919	13,9	Tet.	0,135	384	378
10	14. X. 1919	13,9	„	0,143	365	
11	24. X. 1919	14,1	„	0,250	381	
18	20. IX. 1919	14	Einzelr.	0,233	355	355
19	23. IX. 1919	14	„	0,173	320	
20	26. IX. 1919	14	„	0,122	388	
22	8. XI. 1919	14	„	0,292	359	
6	25. XI. 1921	14	Tet.	0,232	334	367
7	26. XI. 1921	14	„	0,171	385	
8	5. XII. 1921	14	„	0,182	377	
Gesamtdurchschnitt						370

Im Anschluß an Tabelle III und die Tabelle XIV, S. 265. Energieumwandlungen I sind in der Tabelle IV für die am besten vergleichbaren Versuche bei 14° und 22°, Einzelreizung und Tetanus, die Resultate zusammengestellt, wobei die älteren Versuche um 3% für die Milchsäurebestimmung korrigiert sind. Die Übereinstimmung zwischen den verschiedenen Serien erscheint so gut, als bei der Schwierigkeit der einzelnen Messung und der dadurch bedingten erheblichen Fehlerbreite, bei der bedeutenden Variation des Milchsäureendwertes (zwischen 0,33 und 0,129%) und den wechselnden Versuchsbedingungen möglich ist.

b) Der calorische Quotient in der zerschnittenen Muskulatur.

Während sich im vorigen Abschnitt keine Anhaltspunkte für eine deutliche Variation des calorischen Quotienten bei verschiedenen Arten der Reizung und verschiedenen Temperaturen ergaben, und die etwa vorhandenen Unterschiede jedenfalls kleiner sein dürften als es nach den früher erhaltenen Mittelwerten erschien, ist es für das uns beschäftigende Problem von besonderer Wichtigkeit, Variationen des calorischen Quotienten von einem Umfange und unter Bedingungen zu erhalten, daß an ihrer Realität nicht gezweifelt werden kann. Unter diesem Gesichtspunkt ist der calorische Quotient in der zerschnittenen Muskulatur von hohem Interesse, der bisher noch nicht bestimmt worden ist. Wie früher gezeigt¹⁾, gelingt es, in der in ungefähr isotonischer Lösung von Natriumphosphat suspendierten zerschnittenen Muskulatur das gesamte präformierte Glykogen bei gewöhnlicher Temperatur in Milchsäure umzuwandeln und bei äußerem Zusatz von Glykogen eine weitere erhebliche Milchsäureausbeute zu erhalten. Während der Vorgang in wesentlichen Punkten mit der Milchsäureproduktion des intakten Muskels übereinstimmt, muß doch offenbar der Unterschied darin bestehen, daß die gebildete Milchsäure in die Lösung übertritt, ebenso wie ja umgekehrt das Phosphat an die Stätte der Milchsäurebildung gelangt, mag diese nun nur an der festen Struktur zu suchen sein oder in einem mehr oder weniger davon ablösbaren Ferment bestehen. Für das folgende ist es daher von Wichtigkeit festzustellen, wie die entstandene Milchsäure sich auf die zerschnittene Muskulatur und die Lösung verteilt und ob die in der letzteren befindliche frei, d. h. nicht an kolloide Komplexe gebunden ist.

Die folgenden 4 Verteilungsmessungen ergeben, daß bei längerer Versuchsdauer eine nahezu gleichmäßige Verteilung der Milchsäure zwischen der Volumeneinheit Lösung und Gewichtseinheit Muskulatur eintritt, bei den 8stündigen Versuchen (Nr. 3 mit Glykogenzusatz, Nr. 4 ohne Glykogenzusatz) ist offenbar ein vollkommener Ausgleich eingetreten.

Versuch 1. 24. VI. In 3 Stunden bei 20,5° 12 g zerschnittene Muskulatur + 56 ccm 2,4proz. Phosphat. In 30 ccm der abfiltrierten Phosphatlösung sind

¹⁾ Energieumwandlungen IV., Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **188**, 114. 1921.

am Schluß 21,2 mg Milchsäure. Andererseits in den restierenden 26 cem Lösung 32 + 12 g Muskulatur 28,8 mg. Da sich in 26 cem Lösung 18,4 mg befinden, bleiben 10,4 mg für die Muskulatur. Im ganzen sind danach 39,6 mg in 56 cem Lösung und 10,4 mg in 12 g Muskulatur. Der Gehalt der ersteren beträgt somit **0,071%**, der letzteren **0,087%** bei einer Milchsäurebildung der Muskulatur von **0,44%** pro Gewichtseinheit Muskulatur.

Versuch 2. 8. VII. In 6 Stunden bei 20,5° 12 g Muskulatur + 61 cem 3,6 proz. Phosphat + 9% Alkohol + 0,25% Glukose. In 50 cem abfiltrierter Lösung sind 39,6 mg Milchsäure, im Rest 21 mg. Es kommen auf 11 cem Lösung 8,6 mg, also auf 12 g Muskeln 12,4 mg. Milchsäuregehalt der Lösung **0,08%**, der Muskulatur **0,10%** bei einer Milchsäurebildung von **0,504%** pro Gewichtseinheit Muskeln.

Versuch 3. 2. VII. In 8½ Stunden bei 20,5° 15,0 g zerschnittene Muskulatur + 50 cem 3,6 proz. Phosphat + 9% Alkohol + 0,25% Glykogen. In 10 cem der abfiltrierten Phosphatlösung sind 21,9 mg Milchsäure, im Rest 117 mg Milchsäure. Es kommen auf 40 cem 87,5 mg Milchsäure, auf 15 g Muskulatur 29,5 mg. Der Gehalt der Lösung ist also **0,22%**, der Muskulatur **0,20%** bei einer Milchsäurebildung von **0,92%** pro Gewichtseinheit Muskeln.

Versuch 4. 19. X. In 8 Stunden bei 20° 21,6 g Muskulatur + 210 cem 3,6 proz. Phosphat + 4% Alkohol. In 200 cem abfiltrierter Lösung sind 212 mg Milchsäure, im Rest 35 mg Milchsäure. Davon entfallen auf 10 cem Lösung 10,6 mg, auf 21,6 g Muskeln 24,4 mg. Milchsäuregehalt der Lösung **0,106%**, der Muskulatur **0,113%**, bei einer Milchsäurebildung von **1,14%** pro Gewichtseinheit Muskulatur.

Daß die in der Phosphatlösung befindliche Milchsäure daselbst frei diffusibel ist, läßt sich durch Einhängen einer mit Phosphatlösung gefüllten Dialysierhülse (von Schleicher & Schüll) leicht erweisen.

Z. B. *Versuch 5.* 20. IX. 16,5 g zerschnittene Muskulatur + 57 cem 3,6 proz. Phosphat 9h bei 20°. Von der abfiltrierten Flüssigkeit werden 5 cem sofort verarbeitet und enthalten 9,6 mg Milchsäure. (Dies entspricht einem Flüssigkeitsgehalt von 0,192%, bei totalem Ausgleich einem Gesamtgehalt von 138 mg Milchsäure = 0,837% pro Gewichtseinheit Muskeln.) 46 cem Flüssigkeit werden gegen 15 cem in der Pergamenthülse befindlicher 3,6 proz. Phosphatlösung 38 Stunden lang mit Toholuzusatz im Eisschrank dialysiert, dann 5 cem des Hülseinhalt auf Milchsäure verarbeitet, ergeben **7,0 mg**. Berechnet $9,6 \cdot \frac{46}{61} = \mathbf{7,25}$ mg.

Dem entsprechen nun andere Versuche, die später Erwähnung finden: Wenn man von außen zu zerschnittener Muskulatur in Phosphatlösung Milchsäure zusetzt, so verteilt sie sich im besten Fall so, daß in der Volumeneinheit Muskulatur ebensoviel Milchsäure wie in der Lösung vorhanden ist, meist überwiegt der Gehalt in der letzteren. Die Muskulatur bindet also weder chemisch noch durch Adsorption meßbare Mengen Milchsäure. Damit stimmt überein, daß beim Zufügen der Milchsäure zur Suspension der Muskulatur genau dieselbe Wärmetönung auftritt wie bei Zusatz zur reinen Suspensionsflüssigkeit ohne Muskulatur; ist diese Phosphatlösung, so erhalten wir die Wärmetönung der Reaktion $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{HL} = \text{NaH}_2\text{PO}_4 + \text{NaL}$, die ich zu 19 cal. pro 1 g Milchsäure bestimmt habe (mit L wird zur Abkürzung das Anion der Milchsäure bezeichnet).

Während in den Reizversuchen des vorigen Kapitels die entstandene Milchsäure zu etwa 95% im Muskelinnern zurückbleibt, tritt hier ein aliquoter Teil der Säure in die Lösung über, wobei sich die Muskel-

substanz kaum anders wie eine Phosphatlösung verhält. Die Milchsäure muß sich daher mit Biphosphat nach obiger Gleichung umsetzen. Wenn unsere Annahme zutrifft, daß die einzige energetisch in Betracht kommende Reaktion die Milchsäurebildung aus Glykogen ist, so müssen wir unter diesen Umständen eine Wärme finden, die sich zusammensetzt aus der Spaltungswärme Glykogen $\rightarrow$ Milchsäure, der Verdünnungswärme der entstandenen Milchsäure und der Umsatzwärme mit Phosphat. Die Forderung, nur thermochemisch zugängliche Vorgänge zu benutzen, wird noch genauer erfüllt, wenn statt der Spaltungswärme des präformierten Glykogens die von zugesetztem, kolloid gelösten, gemessen wird. Denn dieses besitzt ja keine Lösungswärme, während sich das Glykogen im Muskel in einer Phase befinden könnte, durch die eine kleine Änderung seines Energieinhaltes bedingt wird¹⁾. Die isolierte Messung der Umsatzwärme gelösten Glykogens ließ sich nicht genau durchführen; dagegen gaben 2 Versuche, bei denen zur Hauptsache gelöstes, zum kleineren Teil präformiertes Glykogen zersetzt wurde, innerhalb der Fehlergenauigkeit der Messungen denselben Wert wie diejenigen, in denen nur präformiertes Glykogen in Milchsäure umgewandelt wurde.

Methodik und Ausführung der Versuche. Die²⁾ Anordnung entsprach der früher beschriebenen mit zerschnittener Muskulatur. Als Suspensionsflüssigkeit diente 2,4—3,6proz. Natriumphosphat, häufig mit Zusatz von 5—8% Alkohol, welcher die Milchsäurebildungsgeschwindigkeit um etwa 30% steigert. Die Muskulatur — für jeden Versuch von nur *einem* großen Schenkelpaar stammend — wurde auf eisgekühltem Teller rasch und gleichmäßig zerschnitten, dann so eingeteilt, daß meist für die Wärmemessung die 8fache Menge wie für jede der Kontrollproben in Gaswaschflaschen verwandt wurde. Dementsprechend wurde auch die Menge der Suspensionsflüssigkeit ungefähr im Verhältnis 8 : 1 gewählt. Für die Wärmeversuche dienten kleine dreiwandige Dewarkolben (von C. Burger, Berlin) von 75 ccm Inhalt mit einem Abkühlungskoeffizienten von 6,5% pro Stunde, der bei Durchleiten von Wasserstoff (30—40 Blasen pro Minute) auf 7,2% anstieg. Nur in *einem* Versuch, wo der Einfluß einer größeren Lösungsmenge geprüft werden sollte, wurde ein Kolben von 240 ccm Inhalt mit 2,3% stündlichem Abkühlungskoeffizienten verwandt.

Wurde nur die Umsatzwärme des präformierten Glykogens gemessen, so genügte neben dem Wärmeversuch *eine* Kontrollflasche, die sich ebenfalls im Thermostaten befand und deren Inhalt genau gleich wie der des Wärmeversuchs behandelt wurde. Diese wurde im Moment, wo die genaue Wärmemessung beginnen konnte (frühestens $\frac{3}{4}$ —1 Stunde nach Einhängen des Gefäßes in den Thermostaten) herausgenommen und auf Milchsäure, meist auch auf Glykogen verarbeitet. Sie gab den notwendigen Anfangswert. In der Regel wurde noch eine zweite Kontrollflasche verwandt, die während des Wärmeversuchs im Thermostaten blieb und am Schluß wie diese auf Milchsäure verarbeitet wurde. Durch die ganze Anordnung strömte langsam vorgewärmter Wasserstoff

¹⁾ Vielleicht besitzt es eine Hydratationswärme, die aber wohl nur sehr gering sein dürfte.

hindurch. Die Wärmemessung wurde abgebrochen, wenn aus dem Temperaturverlauf zu ersehen war, daß mindestens die Hauptmenge des Glykogens umgesetzt und die Reaktionsgeschwindigkeit erheblich verlangsamt war. Eine völlige Übereinstimmung des Wertes des Wärmeversuchs mit dem Endwert der Kontrollflasche war kaum zu erwarten und wurde auch nicht gefunden, da die Muskulatur im Dewargefäß sich nicht in ganz derselben Verteilung und obendrein bei einer langsam ansteigenden Temperatur befand gegenüber der direkt im Thermostaten befindlichen. Immerhin konnte dieser Endwert in Verbindung mit gleichzeitiger Glykogenbestimmung zur Kontrollierung des Anfangswertes benutzt werden. Die aus der Vorkontrolle und dem Endwert des Wärmeversuchs berechnete Milchsäurebildung in der Versuchszeit wurde mit der gleichzeitigen Wärmeproduktion verglichen. Die Wasserverte der benutzten Dewarflaschen waren schon bei früherer Gelegenheit bestimmt. Die spezifische Wärme der *Volumeneinheit* Flüssigkeit wurde gleich 1,0 gesetzt; die durch den Salzgehalt und die Muskelsubstanz veranlaßte Verkleinerung wird durch den Alkoholzusatz annähernd kompensiert (spezifische Wärme von 5proz. Alkohol 1,015); der Fehler dürfte unter 1% gelegen sein.

Umständlicher gestaltete sich die Bestimmung der Umsatzwärme von zugesetztem Glykogen. Zuerst wurde versucht, diese für sich zu messen, indem zunächst die Zersetzung des präformierten Glykogens abgewartet wurde, dann die eine Kontrolle zur Bestimmung des Milchsäuregehalts entfernt und nunmehr nach Glykogenzusatz die Wärmemessung begonnen wurde. Um nach dem Temperatúrausgleich das Glykogen zuzufügen, befand sich dasselbe in konzentrierter Lösung (ca. 12%) in einer 2 ccm fassenden Pipette im Dewargefäß und wurde zu Versuchsbeginn durch Wasserstoff herausgedrückt. Unter zahlreichen Versuchen dieser Art mißglückten die meisten oder gaben mindestens ungenaue Werte; es lag dies daran, daß der letzte Rest des präformierten Glykogens sehr langsam schwindet und daß bei vielstündigem Aufenthalt im Thermostaten die Milchsäurebildung im Wärmegefäß und Kontrollgefäß nicht ganz genau gleich verlaufen, so daß der Anfangswert des Wärmeversuchs unsicher wird. Ist dann die Milchsäurebildung aus zugesetztem Glykogen verhältnismäßig gering, so wird der prozentische Fehler außerordentlich groß. Wartet man andererseits so lange, daß der Totalumsatz des präformierten Glykogens vollständig erreicht ist, so ist das Vermögen der Muskulatur, zugesetztes Glykogen zu zersetzen, stark verschlechtert. Von derartigen Versuchen führe ich in der nachfolgenden Tabelle nur 2 an, die relativ große Umsätze ergaben und einigermaßen genau sein dürften. Doch sind dabei die kalorischen Quotienten wegen der Unsicherheit des Anfangswertes eingeklammert. Es gelang jedoch mehrmals recht gut, den Umsatz des präformierten und zu-

gefügten Glykogens im selben Versuch zu kombinieren, indem nach etwas längerem Aufenthalt im Thermostaten, wobei schon ein erheblicher Teil des präformierten Glykogens umgewandelt wird, zu Beginn des Wärmeversuchs aus der im Dewargefäß befindlichen Pipette das Glykogen herausgedrückt und gleichzeitig in der Kontrolle der Milchsäure- und Glykogenanfangsgehalt bestimmt wird. Unter diesen Umständen wurde in 5 Stunden bei 22° bis zu 1% Milchsäure gebildet, wovon etwa $\frac{2}{3}$ aus dem zugesetzten Glykogen stammen. Die Messung gestaltete sich ebenso genau wie bei den Versuchen ohne Glykogenzusatz. Das benutzte Glykogen von Merck war nicht rein, seine spezifische Drehung betrug 170° statt 196°; es war also nicht ganz 90 proz.

Die Möglichkeit dieser Versuche fußt auf den Resultaten von Kapitel III, Energieumwandlungen IV, über die Umwandlung zugesetzten Kohlenhydrats in der zerschnittenen Muskulatur, und alle wesentlichen dort gezogenen Schlußfolgerungen ließen sich wieder bestätigen. Es sei daher anhangsweise auf die Kritik eingegangen, die *Laquer* in der oben zitierten Arbeit an diesen Versuchen übt. Er hebt in der Einleitung hervor, daß meine Ergebnisse mit den seinigen teils übereinstimmen, teils im Widerspruch stehen. Es zeigt sich jedoch, daß, soweit ein Vergleich seiner 3stündigen, bei 30° und 45° angestellten Versuche mit den meinigen 8—22stündigen bei 14° und 22° statthaft ist, er alle meine Resultate bestätigt, mit Ausnahme von einem einzigen, im Zusammenhang meiner Arbeit recht unwichtigen Punkt, wo die Diskrepanz offenbar durch die ungünstigeren Versuchsbedingungen bei mir verursacht ist. Nachdem nämlich von mir gezeigt war, daß zugesetztes Glykogen von der Muskulatur in Phosphatlösung in Milchsäure transformiert wird, wurde versucht, dies unter Kautelen, die ein Aufkommen von Bakterien sicher ausschlossen, zu wiederholen. Es gelang nun nicht in zwei Versuchen bei Anwesenheit von Blausäure — während Hexosen dabei umgesetzt wurden — wohl aber dann mit Äthylalkohol. *Laquer* findet dagegen (bei 30—45° in 3 Stunden) keinen Einfluß der Blausäure auf die Milchsäurebildung aus zugesetztem Glykogen. Weit entfernt davon, aus meinen Versuchen den mir von *Laquer* zugeschriebenen „völlig unberechtigten Schluß“ zu ziehen, „daß Cyankali die Milchsäurebildung aus Traubenzucker unbeeinflußt läßt, dagegen die aus Glykogen hemmt, da die Muskeldiastase gegen Blausäure empfindlich sei“, habe ich nur die Vermutung ausgesprochen, daß das Resultat offenbar nicht durch Interkurrenz von Bakterien in den blausäurefreien Versuchen bedingt wäre, sondern durch irgendeine Komplikation in den blausäurehaltigen. Seite 134: „und viel eher war an eine Komplikation, z. B. (!) eine gewisse Blausäureempfindlichkeit der Muskeldiastase zu denken, zumal das Glykogen selbst die Milchsäurebildungsgeschwindigkeit merklich herabsetzt und auch höhere Blausäurekonzentrationen nicht unschädlich sind.“ Von dieser Vermutung, daß kombinierte Schädlichkeiten für das negative Resultat verantwortlich sind, wurde nur insoweit Gebrauch gemacht, als sich zeigen ließ, daß unter Zusatz von 3,5—7% Äthylalkohol, der ein Aufkommen von Bakterien in der Versuchszeit verhindert, eine beträchtliche Milchsäurebildung aus Glykogen zu erhalten ist. Nach den Versuchen von *Laquer* und einigen späteren von mir selbst darf man annehmen, daß die hauptsächlichste Komplikation in der Benutzung von Winterfröschen bestand, bei denen die Milchsäurebildung aus zugesetztem Glykogen schon an und für sich erheblich geringer als bei Sommerfröschen ist. Die übrige Kritik *Laquers* bezieht sich auf die Umwandlung von Hexosen in Milchsäure in meinen Versuchen, deren Resultate er, soweit er sie geprüft hat, bestätigt, dabei aber behauptet, daß die meinigen wegen

zu „winziger Ausschläge“ nicht genügend beweisend seien. Dies erkenne ich nicht als richtig an; denn die Mehrbildung von Milchsäure in Gegenwart von Zucker beträgt absolut 0,07—0,2% des Muskelgewichts, und 8—16% bezogen auf den Milchsäuregehalt der Kontrollen. Der geringste Ausschlag liegt schon über der Fehlergrenze. Nur eine Äußerung des Textes moniert er zu Recht. Die Differenzen, die in einem Versuch (38) zwischen der Wirksamkeit verschiedener Hexosen gefunden wurden, liegen in der Tat unterhalb der Fehlergrenze und es war daher unzulässig zu sagen, daß auf Glucose „in absteigender Reihe“ Fructose, Maltose, Galaktose folgt. Schließlich erhebt *Laquer* noch gegen das von *Parnas* und *Wagner*, mir und anderen benutzte Verfahren der Kohlenhydratbestimmung den Vorwurf, daß damit das Gesamtkohlenhydrat des Muskels nicht sicher erfaßt würde, da bei der Säurehydrolyse eventuell nicht alle Kohlenhydrate zu Hexose zersetzt oder auch reduzierende Zucker abgespalten würden, die mit der Milchsäurebildung in keinem Zusammenhang stünden. Diesen Umstand habe ich jedoch nicht übersehen, vielmehr (S. 121) darauf ausdrücklich Bezug genommen. Für die von mir studierten Zusammenhänge zwischen Milchsäure- und Kohlenhydratbilanz ist dies jedoch gleichgültig; denn alle dort gezogenen Schlüsse beruhen auf *Differenzbestimmungen*, wobei zu Anfang und Schluß des Versuchs unter gleichen Umständen die Menge des durch Säurehydrolyse bestimmter Dauer zu gewinnenden reduzierenden Zuckers gemessen worden ist. Übrigens sind meine Versuche über den Zusammenhang von Kohlenhydrat- und Milchsäurebilanz im Froschmuskel inzwischen im Laboratorium von *F. G. Hopkins* in Cambridge mit ähnlichen Methoden, aber größeren Mengen Muskulatur wiederholt und völlig bestätigt worden. Er sagt darüber¹⁾: „We have been impressed by the exactness with which the amount of lactic acid formed under any circumstances corresponds with the amount of carbohydrate simultaneously disappearing.“

Andererseits ist von *Laquer* ein Fortschritt bezüglich der Umwandlung zugesetzten Kohlenhydrats in Milchsäure dadurch erzielt worden, daß er die Ursache für die erheblichen Unterschiede fand, die darin die Muskulatur verschiedener Frösche aufweist. Die geringe Milchsäureausbeute bei Winterfröschen ließ sich durch mehrtägigen Aufenthalt im Brutschrank bei 24°, also Umschaltung auf den Sommerstoffwechsel, bis zur Leistung von Sommerfröschen steigern. Diese Erfahrung habe ich mir einige Male zunutze gemacht und für mehrere Versuche dieses Kapitels die Frösche 2—3 Tage vor der Verwendung im warmen Zimmer gehalten.

Von den Versuchen dieses Abschnittes sei einer genauer geschildert, während die übrigen nur in der Tabelle V zusammengestellt sind.

Versuch 7, Tab. V. 12. XI. 1921. Frosch mehrere Tage im warmen Zimmer gehalten, dann vor dem Töten 40 Minuten in Eiswasser, Muskeln 10^h a. m. zerschnitten, 19,6 g. Für Wärmeversuch 13,6 g, für drei Kontrollversuche je 1,7 g Suspensionsflüssigkeit 3,6% Phosphat mit 8 Volumenprozent Alkohol. Davon je 7 cem in die Kontrollflaschen I, II, III und soviel in das Dewargefäß, daß die gesamte Flüssigkeitsmenge (mit Muskulatur) 66 cem beträgt. Vorher ist die Phosphatlösung auf Thermostatentemperatur vorgewärmt und durch längeres Durchleiten von Wasserstoff sauerstofffrei gemacht. Eingehängt eine Pipette mit 2 cem 10proz. Glykogenlösung. Um 10^h 20' werden die drei Kontrollflaschen und das Calorimetergefäß in den Thermostaten gehängt und an den Wasserstoffapparat angeschlossen. Thermostatentemperatur gleich 1,33° Beckmann. Die Temperatur des Dewargefäßes beim Einhängen 0,926°, steigt bis 11^h 19' auf 1,066°. Jetzt

¹⁾ John Hopkins Hospital bulletin **32**, Nr. 368, S. 363. 1921. Herter lecture der John Hopkins Universität 13. IV. 1921. Ferner: *D. L. Foster* und *D. M. Moyle*, Biochem. Journ. **15**, 672. 1921.

wird das Glykogen durch Wasserstoff herausgedrückt und von da an das Gas (40 Blasen pro Minute) durchgeleitet. Gleichzeitig Kontrolle I in Eiswasser gestellt und verarbeitet, und in Kontrolle II 0,25 ccm 10proz. Glykogen eingefüllt. Kontrolle III bleibt unverändert. Temperaturablesungen 11^h 20' 1,066°; 11^h 50' 1,154°; 12^h 20' 1,228°; 1^h 20' 1,308°; 1^h 40' 1,327°; 3^h 45' 1,385°; 4^h 40' 1,395°. 4^h 40' Wärmeversuch, Kontrolle II und III in Eiswasser und verarbeitet.

Abkühlungskoeffizient 7,2%, gemessener Temperaturanstieg 5 Stunden 20 Min. (11^h 20' bis 4^h 40') 0,329°, ab Korrektur für Wärmeausgleich — 0,010° = 0,319°. 68 ccm Flüssigkeit + 10 Gefäßwasserwert = 78. Gebildet **24,9 Cal.** oder pro 1 g **1,83 Cal.**

Milchsäureverarbeitung. Jodtiter 0,0103 n. Kontrolle I 20 ccm Alkohol-extrakt. Je 10 ccm geben 10,8 und 10,8 ccm Jod (unkorrigiert). Mit Titer und Verlustkorrektur auf 20 ccm berechnet 11,8 mg = **0,693%** als Anfangswert. Glykogenbestimmung im Muskelrückstand I (nach *Pflüger-Bertrand*, Modifikation *Möckel-Frank*) gibt 6,8 mg Glykogenzucker auf 1,7 g = 0,40% Glykogen, mit Korrektur nach *Pflüger* **0,41%**.

Kontrolle III (ohne Glykogenzusatz). Von 20 ccm 5 ccm verarbeitet: 8,65 ccm Jod unkorrigiert. In 20 ccm 18,9 mg Milchsäure = **1,11%**. Glykogenbestimmung **0,0%**. Es sind also 1,11—0,69% = **0,42%** Milchsäure aus präformiertem Glykogen gebildet, bei einem gemessenen Glykogenschwund von **0,41%**.

Kontrolle II (mit Glykogenzusatz). 5 ccm von 20 ccm verarbeitet: 13,05 ccm Jod unkorrigiert. Im ganzen 28,6 mg Milchsäure = 1,68%. Es sind im ganzen **0,99%** Milchsäure gebildet, davon **0,57%** aus zugesetztem Glykogen.

Wärmeversuch. Je 5 ccm von 100 ccm verarbeitet geben: 20,05 ccm Jod; 20,2 ccm Jod, im ganzen 220 mg Milchsäure = 1,65%. Es sind also im Wärmeversuch **0,93%** Milchsäure, davon **0,51%** aus zugesetztem Glykogen gebildet.

Pro 1 g Muskel erhalten 1,83 cal. und 0,0093 g Milchsäure,

$$c Q = \frac{1,83}{0,0093} = 197.$$

Tabelle V. Der kalorische Quotient in der zerschnittenen Muskulatur.

A. Wärmeversuche.

Nr.	Datum	Vers.-Temp. Grad	Muskel g	Lösung	Glykogen-zusatz	Zeit d. Zusatz. nach Zerschnitt.	Dauer des Wärmeversuches	Gesamt-wasser-versuch	Korr. Temp.-Anstieg ° C	cal.	cal. pro 1 g Muskel
1	7. IX.	22,5	21,6	3,6% Phosphat + 8% Alkohol	+	3 ^h	5 ^h 45'	82,5	0,234	19,3	0,893
2	5. X.	20	26,3	3,6% Phosphat + 7% Alkohol	+	6 ^h 30'	3 ^h 15'	83	0,146	12,1	0,45
3	8. X.	20	16,0	3% Phosphat	—	—	5 ^h 30'	80	0,3075	24,6	1,54
4	11. X.	20	12,8	3,6% Phosphat	—	—	5 ^h 20'	79	0,127	10,0	0,78
5	13. X.	20	16,0	3,6% Phosphat	—	—	7 ^h 50'	81	0,339	27,4	1,71
6	18. X.	20	21,6	+ ⁿ / ₂₀₀₀ -KCN + 3,5% Alkohol	—	—	7 ^h	248	0,1225	30,4	1,41
7	12. XI.	20	13,6	3,6% Phosphat + 6% Alkohol	+	1 ^h 15'	5 ^h 30'	78	0,319	24,9	1,83
8	19. XII.	22	10,4	3,6% Phosphat + 5% Alkohol	+	1 ^h 10'	5 ^h 40'	73	0,274	20,0	1,925

B. Milchsäurekontrollversuche.

Nr.	Je g Muskel und cem Lösung	Milchs. vorher	Milchs. vorher	Milchs. nachher ohne Gly- kogen- zusatz	Milchs. nachher ohne Gly- kogen- zusatz	Milchs. nachher mit Gly- kogen- zusatz	Milchs. nachher mit Gly- kogen- zusatz	Ver- braucht präfor- miertes Glykogen
		mg	%	mg	%	mg	%	%
1	2,4 g : 6 cem	18,9	0,79	21,8	0,91	31,4	1,30	0
2	3,5 g : 7 cem	36,8	1,05	41,5	1,19	—	—	—
3	2 g : 7 cem	6,52	0,326	23,7	1,185	—	—	—
4	1,6 g : 7 cem	6,37	0,400	14,7	0,92	—	—	0,50
5	2,0 g : 8 cem	5,35	0,268	20,7	1,035	—	—	—
6	1,2 g : 12 cem	4,3	0,36	13,5	1,13	—	—	0,765
7	1,7 g : 7 cem	5,9	0,693	18,9	1,11	28,6	1,68	0,41
8	1,3 g : 7 cem	8,15	0,627	—	—	18,25	1,40	0,26

C. Milchsäureendwerte im Wärmeversuch und Gesamtbilanz.

Nr.	Aliquoter Teil zur Milchsäure- bestimmung	Darin Jod unkorr.	Milchsäure im ganzen	Milchs.	Milchs. Anfangs- wert	Milchs. gebild.	Davon aus zu- ges. Gly- kogen (berechnet)	c Q
		cem	mg	%	%	.		
1	2 : 50	22,5	299	1,38	0,79	0,53	0,47	(170)
	2 : 50	22,1			0,91			
2	2 : 100	12,55	336	1,28	1,05	0,23	0,09	(195)
3	5 : 100	16,4	176	1,10	0,326	0,774	0	199
	5 : 100	16,5						
4	5 : 100	9,35	100	0,78	0,40	0,38	0	205
5	5 : 100	15,65	168	1,050	0,208	0,782	0	219
	5 : 100	15,1						
6	5 : 100	6,6	35	1,145	0,36	0,785	0	180
	5 : 100	6,65						
	Schenk ¹⁾		212	1,145	0,36	0,785	0	180
	10 : 400	10,6						
	10 : 400	10,9						
7	5 : 100	20,05	220	1,62	0,693	0,93	0,57	197
	5 : 100	20,2						
8	10 : 190	17,1	161,5	1,552	0,627	0,925	0,66	208
	10 : 190	17,05						

Der kalorische Quotient ergibt sich im Durchschnitt der 6 genauen Versuche zu 201 cal.

¹⁾ Von den 230 cem 200 cem abfiltrierte Flüssigkeit nach *Schenk* verarbeitet.

Da, wie oben gezeigt wurde, die gebildete Milchsäure in die Lösung übertritt, hier in diffusibler Form vorhanden ist und sich mit Phosphat umsetzt, muß sich die gebildete Wärme aus Spaltungs-, Verdünnungs- und Reaktionswärme mit Phosphat zusammensetzen. Die Verdünnungswärme wurde oben zu 14 cal. bestimmt, die Umsatzwärme mit Phosphat ergibt sich zu 19 cal. Ziehen wir dieses von 200 cal. ab, so erhalten wir 167 cal. als Spaltungswärme, fast genau ebensoviel, wie wir oben als Differenz der Verbrennungswärme von Glykogen und Milchsäure festgestellt haben, 157 cal. Wir können auch die Verdünnungswärme der Milchsäure fortlassen und in Kap. I die Verbrennungswärme der verdünnten Säure benutzen, so daß wir in beiden Fällen 170—180 cal. für die Reaktionswärme Glykogen $\rightarrow$ verdünnte Milchsäure erhalten. *Hiermit ist bewiesen, daß sich in der zerschnittenen Muskulatur kein weiterer energetisch in Betracht kommender Prozeß abspielt als der untersuchte.*

c) *Wärme- und Milchsäurebildung im ruhenden Muskel.*

Nunmehr erhebt sich die Frage: Beruht die Differenz von gegen 170 cal. zwischen dem kalorischen Quotienten bei der Kontraktion und in der zerschnittenen Muskulatur auf anderweitigen Stoffwechselvorgängen, die sich neben der Milchsäurebildung im intakten Muskel abspielen und beim Zerkleinern ausgeschaltet werden, oder auf einer eigentümlichen Reaktion der Milchsäure mit Substanzen des intakten Muskelgewebes? Zur Entscheidung dieser Frage kann uns die Milchsäureproduktion im ruhenden Muskel dienen. Bereits in der ersten Arbeit dieser Serie fand sich, daß die anaerobe Milchsäurebildung im ruhenden Muskel der des gereizten vollständig gleichzusetzen ist, mit dem einzigen Unterschied, daß sie weit langsamer vonstatten geht. In beiden Fällen ist das Glykogen die Quelle der Milchsäure. Trotzdem ergab sich das bemerkenswerte Resultat, daß der kalorische Quotient in einer die Fehlergrenze deutlich überschreitenden Weise herabgesetzt war, nämlich auf 280 cal. (260—310) gegenüber 390 cal. bei der tetanischen Kontraktionswärme gleicher Temperatur. Schon dort wurde als Ursache dieser Abweichung die Hypothese aufgestellt, daß sie von dem Entweichen der Milchsäure aus dem Muskel herrührt, da sich in den 22stündigen Ruhewärmeversuchen mit enthäuteten Froschschenkeln etwa 40—50% in der umgebenden Lösung finden. Diese Hypothese ist leicht zu prüfen. Wir brauchen dafür nur den kalorischen Quotienten bei der Ruheanaerobiose von *nicht abgehäuteten* Froschschenkeln in *kürzeren* Zeiträumen in *neutraler* Ringerlösung zu bestimmen, wobei die Milchsäure zum größten Teil im Muskel zurückbleiben muß, und ihn zu vergleichen mit dem Quotienten *abgehäuteter*

Froschschenkel in *längeren* Zeiträumen in *alkalischer, carbonatreicher* und (eventuell phosphathaltiger) Ringerlösung. In der letzten Arbeit konnte gezeigt werden, daß in eine derartige Lösung ein beträchtlicher Teil der Milchsäure übertritt. Daß dann der Umsatz zum Teil mit Bicarbonat, zu einem Teil mit Phosphat geschieht, spielt kalorisch keine Rolle, denn die Umsatzwärme der Milchsäure mit dem ersteren beträgt ebenfalls um 20 cal.

Die Resultate sind in der Tabelle VI zusammengestellt, wobei zunächst die mit nicht enthäuteten, dann die mit abgehäuteten Schenkeln aufgeführt sind. Im letzteren Fall wurden etwas kleinere Froschschenkel gewählt, um die Herausdiffusion der Milchsäure zu erleichtern. Die alkalische Carbonat-Phosphat-Ringerlösung bestand aus einem Gemisch von 185 ccm Ringerlösung + 25 ccm 2,4proz. Phosphat + 18 ccm 4proz. NaHCO_3 + 2 ccm 4proz. Na_2CO_3 , p_{H} ca. 9,2—9,5 (stark trübe durch Ausfällung von Calcium). In der Übersicht Tab. VI C sind wiederum die älteren Versuche unter Korrektur der Milchsäurezahlen des Muskelextraktes und der dadurch bedingten geringfügigen Korrektur des kalorischen Quotienten mit aufgeführt. Die Versuche sind etwas genauer als die mit elektrischer Reizung infolge des Wegfalls der Reizanordnung. Durch Benutzung eines enghalsigen Dewargefäßes von nur 2,3proz. stündlichem Abkühlungskoeffizienten wurde der Einfluß der längeren Zeit auf die Größe des Korrekturfaktors kompensiert. Für die Milchsäurebestimmung wurde nur je ein Schenkel eines Paares verarbeitet.

Tabelle VI.

Wärme und Milchsäurebildung während der Anaerobiose bei 20° und 22°.

A. Wärmebildung.

Nr.	Datum	Abgehäutet: a. Nicht abgeh.: n.	Zahl der Schenkel	Versuchs- Temperatur Grad	Suspensions- Lösung	Dauer des Versuchs in Stunden	Muskel g	Gesamt- wasser- wert	Korr. Temp.- Anstieg Grad	cal.	Calorien für Anfangszeit	Calorien pro 1 g Muskel
1	23. IX.	n	3	22	Neutr. Ringer + $\frac{n}{2000}$ KCN	6 ^h 30'	51,9	231,5	0,111	25,7	1 ^h 45': 6,9	0,635
2	4. X.	n	3	20	desgl.	6 ^h 45'	60,0	213	0,1155	24,6	1 ^h 30': 5,4	0,50
3	14. X.	n	2	20	desgl. ohne KCN	7 ^h 20'	42,4	219	0,077	16,9	1 ^h 15': 2,7	0,46
4	17. X.	a	3	20	Alkal. Ringer (ohne KCN)	19 ^h 45'	46,75	224,5	0,197	44 2	2 ^h : 5,14	1,055
5	18. XI.	a	3	22	desgl. mit KCN	10 ^h 30'	47,3	224	0,1605	35,9	1 ^h 20': 4,9	0,865
6	17. XII.	a	3	22	desgl. mit KCN	13 ^h 15'	44,9	213	0,1915	40,7	1 ^h 15': 5,1	1,0245

B. Milchsäureversuche.

Nr.	Verarb. Muskel g	Aliquoter Teil zur Be- stimmung	Jod unkorr. ccm	Milch- säure mg	Ringer: Davon verarbeitet ccm	Aliquoter Teil zur Be- stimmung	Jod unkorr. ccm	Milch- säure in Ringerl. mg	Milch- säure %	An- fangs- gehalt
1	23,3	5 : 50 10 : 50	6,8 12,5	79,1	152 : 100	50 : 150	4,45	10,9	0,174	0,010
2	27,7	5 : 50 5 : 50	7,35 7,35	85,2	118 : 100	50 : 150	4,8	8,5	0,156	0,010
3	19,6	10 : 50 10 : 50	7,65 7,1	44,3	150 : 100	50 : 150	3,4	7,65	0,123	0,010
4	21,3	5 : 50 5 : 50 5 : 50	7,1 7,65 7,3	86,5	160,5 : 100	20 : 200 20 : 200	12,6 13,0	102	0,403	0,010
5	21,05	5 : 50 10 : 50	6,7 13,95	69,2	158 : 100	20 : 200 20 : 200	10,1 10,2	80,5	0,317	0,015
6	21,2	10 : 50	14,25	81,6	151 : 100	20 : 200 20 : 200	11,1 11,45	85,5	0,373	0,010

C. Übersicht und Bilanz.

Frü- here Nr.	Datum	Abge- häutet: a Nicht abgeh.: n	Tem- peratur	Versuchs- zeit mit Vorperiode	Milchsäure %	Anteil davon in Ringer- lösung %	cal. pro 1 g und 1 Std.	c. Q.	Durch- schnitt
1	23. IX. 1921	n	22°	8 ^h 15'	0,174	12	0,080	384	378
2	4. X. 1921	n	20°	8 ^h 15'	0,156	9	0,061	342	
3	14. X. 1921	n	20°	8 ^h 35'	0,123	15	0,055	407	
4	17. X. 1921	a	20°	21 ^h 45'	0,403	54	0,048	269	279
5	18. XI. 1921	a	22°	11 ^h 50'	0,302	54	0,073	286	
6	17. XII. 1921	a	22°	14 ^h 30'	0,373	51	0,069	282	
1	14. III. 1919	a	22°	22 ^h	0,406	38	0,044	245	275
2	19. III. 1919	a	22°	25 ^h	0,552	47	0,056	267	
3	2. VI. 1919	a	22°	24 ^h	0,440	45	0,053	304	
4	16. VI. 1919	a	22°	22 ^h 30'	0,443	48	0,052	272	

Das Ergebnis der Versuche der Tab. VI ist völlig eindeutig. Während der kalorische Quotient der Ruheanaerobiose nicht enthäuteter Froschschenkel genau ebenso groß ist wie der bei elektrischer Ermüdung, ist er beim Übergang von gut der Hälfte der gesamten Milchsäure in die umgebende Lösung um etwa 100 cal. herabgesetzt, also ist die Überschußwärme gegenüber der zerschnittenen Muskulatur nur noch 80 cal. Übrigens ergibt sich in den älteren Versuchen, die unter ähnlichen Umständen, wenn auch mit weniger alkalischer Lösung angestellt sind, wie man sieht, genau derselbe Quotient; doch sind diese älteren Versuche im ganzen als weniger genau zu betrachten. Man kann nun noch auf einem anderen Wege beweisen, daß die Herabsetzung des Quotienten

durch den Austritt der Milchsäure aus dem Muskel und den Umsatz mit alkalischen Salzen der Lösung bedingt ist. Denn dieser Austritt wird allmählich und vorwiegend in der späteren Zeit erfolgen und dementsprechend zeigen die Versuche, daß die stündliche Wärme-
produktion dauernd abfällt, während sich aus Kontrollmessungen ergibt, daß die Milchsäurebildung in diesen Zeiträumen (12—20 Stunden) bei 22° in alkalischer Ringerlösung ganz konstant ist. Andererseits zeigen die kürzeren Versuche mit nicht abgehäuteten Froschschenkeln ein viel langsames Fallen oder sogar eine völlige Konstanz der stündlichen Wärme-
produktion.

In Abb. 1 ist der gemessene ($\times \times \times \times$) und korrigierte ($\cdot \text{---} \cdot \text{---} \cdot$) Temperaturanstieg des Versuchs 6 dargestellt. Die gestrichelte Linie würde einem konstanten Anstieg entsprechen. Hier fällt der stündliche Temperaturanstieg von 0,019° pro 1 Stunde auf 0,0115° am Schluß. In Versuch 4 geht dieser Abfall von 0,0145° auf 0,0085°, in Versuch 5, dem kürzesten Versuch der Serie, von 0,019° auf 0,0135°. Andererseits beträgt bei nicht abgehäuteten Fröschen in Versuch 1 der stündliche Temperaturanstieg am Anfang 0,0185°, am Schluß 0,015°. In Versuch 2 am Anfang 0,0195°, am Schluß 0,015°. In Versuch 3 bleibt der Temperaturanstieg konstant und beträgt die ganze Zeit 0,011° pro Stunde. Wenn auch dem einzelnen Wert keine hohe Genauigkeit zukommt, so ist doch der Unterschied in die Augen fallend. Für die Konstanz der Milchsäurebildung in alkalischer Ringerlösung bei 22° sei der folgende Versuch angeführt.

Abb. 1. Wärmebildung bei der Ruheanaerobiose enthäuteter Schenkel in alkalischer Ringerlösung. Vers. 6, Tab. VI. $\times \times \times \times$ gemessener Temperaturanstieg, $\cdot \text{---} \cdot \text{---} \cdot$ korrigierter Temperaturanstieg, $\text{---} \text{---} \text{---}$ theoretischer Temperaturanstieg entsprechend der Wärmebildung der ersten zwei Stunden. Abszisse Tageszeit in Stunden, Ordinate Grad Beckmann-Thermometer. Temperatur 22°. Th Thermostatentemperatur.

Versuch 7. Je ein Froschschenkelpaar in 50 cem alkalischer Ringerlösung (mit KCN) bei 22°. 1. Nach 6½ Stunden verarbeitet: 14,4 g enthalten 26 mg Milchsäure = 0,18%; nach Abzug des Ruheminimums 0,170% oder pro Stunde 0,0262% Milchsäure gebildet. 2. Nach 21 Stunden verarbeitet: 11,4 g enthalten 64,3 mg Milchsäure = 0,565%, gebildet 0,555% oder in 1 Stunde 0,0264%.

Rechnen wir dagegen aus, wie groß die Wärme-
produktion und der kalorische Quotient in den am längsten fortgesetzten Versuchen 4 und 6 mit abgehäuteten Schenkeln in alkalischer Lösung sein würde, wenn

die Calorienproduktion von der 1. Stunde an gleich bliebe, und andererseits, wenn sie im ganzen so gering sein würde, wie es dem Stundenwert am Schluß entspricht, der übrigens aus dem Durchschnitt der ganzen letzten Periode nach Ablauf der ersten 10 Versuchsstunden ermittelt ist, so ergibt sich:

Versuch 4. Bei $0,0145^{\circ}$ Stundenwert: 64,2 cal. statt 44,2. cQ statt 269: **372**.
Dagegen für den Schlußwert $0,085^{\circ}$: 37,6 cal. cQ = **229**.

Versuch 6. Bei $0,019^{\circ}$ Stundenwert 53,6 cal. statt 40,7, cQ statt 282: **372**.
Dagegen bei dem Schlußwert $0,0155^{\circ}$ 32,4 cal. cQ = **224**.

In beiden Fällen ist also der Anfangswert genau derselbe wie bei nicht abgehäuteten Froschschenkeln, der Schlußwert nur wenig höher wie in der zerschnittenen Muskulatur. Dies Ergebnis scheint von großer Wichtigkeit. Aus der Tab. VI und insbesondere aus der hier durchgeführten Berechnung läßt sich keine andere Deutung ableiten, als daß die Differenz zwischen der Kontraktionswärme und der Spaltungswärme Glykogen $\rightarrow$ Milchsäure allein durch eine Reaktion der Milchsäure mit Substanzen des intakten Muskelinnern bedingt ist und durch keinerlei weitere Nebenreaktionen. Da übrigens die Messung der Ruheanaerobiose als verhältnismäßig genau angesehen werden kann und die Gleichheit des kalorischen Quotienten mit dem der Kontraktionswärme bei nicht abgehäuteten Fröschen kaum zweifelhaft ist, möchte ich als Durchschnittswert 370—380 cal. annehmen (ob auch der Übergang einer geringen Menge Milchsäure in die Lösung schon eine Verkleinerung hervorruft, wird später erörtert werden.) Im folgenden wird mit **375 cal.** als Normalzahl gerechnet, die Unsicherheit dürfte weniger als $\pm 5\%$ betragen.

Von einer Neubestimmung des kalorischen Quotienten der Chloroformstarre wurde Abstand genommen. Dieser ergab sich früher zu 340 cal., was nach der jetzigen Berechnung etwa 335 sein würde, und liegt also zwischen den beiden Werten des kalorischen Quotienten, die in diesem Abschnitt gefunden wurden. Dabei waren 60—70% der Milchsäure in die umgebende Lösung übergetreten. Da aber gleichzeitig eine große Menge Eiweiß aus den Schenkeln ausgelaugt wird und der kolloidale Zustand des Muskeleiweißes stark verändert wird, lassen sich die Zahlen für die uns interessierende Reaktion der Milchsäure nicht verwerten.

Kapitel III. Über Wärmebildung beim Eindringen von Säure in den Muskel.

Da das H-Ion als der aktivste Teil der Milchsäure anzusehen ist, liegt es nahe, das erstere für das Zustandekommen der Wärmebildung in Anspruch zu nehmen. Wir fragen daher, ob beim Eindringen von Säure in den intakten Muskel eine Wärmetönung nachweisbar ist, die

beim Eindringen neutraler Substanzen sich nicht findet. *Und dies ist in der Tat der Fall.* Milchsäure selbst als eindringende Substanz zu benutzen, erscheint nicht zweckmäßig, weil dann der Nachweis einer positiven Wärmetönung nicht beweisend wäre. Denn es muß ausgeschlossen werden, daß die permeierende Säure eine Milchsäureproduktion im Muskel auslöst, die ihrerseits Wärme bildet. Als Säure, die diese Kontrolle leicht gestattet und bei der Milchsäurebestimmung nicht störend wirkt, die ferner gut permeabel ist und andererseits so stark dissoziiert, um mit der Milchsäure verglichen werden zu können, fand sich nach einigem Probieren die *Valeriansäure*. Ihr Eindringen ruft nicht nur keine Milchsäurebildung hervor, sondern hemmt sogar den anaeroben Milchsäurebildungsvorgang sehr bald, vielleicht als Folge der hohen Wasserstoffionenkonzentration im Muskelinnern. Der einzige Übelstand war, daß sie verhältnismäßig schwer löslich ist (etwa 4%) und in meiner Anordnung der Zusatz konzentrierter Säure im Überschuß notwendig war: 2 ccm einer 15proz. oder 20proz. Emulsion. Die Lösungs- und Verdünnungswärme mußte daher in Abzug gebracht werden. Das Eindringen der Valeriansäure in die Schenkelmuskulatur ruft bei den hier angewandten Versuchsbedingungen keine Starre, sondern höchstens mit der Zeit eine Gerinnung einzelner Muskelpartien hervor, führt aber rasch zur Lähmung. Nur in der etwa $1\frac{1}{2}$ Stunden dauernden Vorperiode, die für den Temperatenausgleich erfordert wird, ehe die Valeriansäure zugesetzt werden kann, wird natürlich dauernd Milchsäure gebildet; deren Menge muß von dem Endwert des Milchsäuregehalts in Abzug gebracht werden, damit man die nach Valeriansäurezusatz produzierte Milchsäure und deren Wärmeäquivalent berechnen kann. Dieser Wert wird von der gemessenen Gesamtwärme in Abzug gebracht. Der Rest ist durch das Eindringen der Säure bedingt. In einer Reihe von Versuchen ergab sich, daß beim Zusatz von etwa 0,4 g Valeriansäure zu 40 ccm Lösung mit 30 g intakten Schenkelmuskeln im ganzen 6—10 cal. oder pro 1 g Muskel 0,20—0,35 cal. auftreten, für die kein Milchsäureäquivalent vorhanden ist. Wenn auch der absolute Wert infolge der anzubringenden Korrektur nie ganz genau ist, so ist das Gesamtergebn zweifelsfrei; denn die auf Milchsäurebildung zu beziehende Wärme macht in der Regel nur $\frac{1}{3}$ — $\frac{1}{4}$ der gemessenen Wärme aus. Läßt man die Valeriansäure bei tieferer Temperatur (14°) eindringen, so ist auch die Milchsäurebildung der Vorperiode so gering, daß der gesamte Milchsäuregehalt bei weitem nicht ausreichen würde, um die allein in der Beobachtungszeit gemessene Wärme erklären zu können.

In der Tab. VII sind die Versuche angeführt. Die Lösungs- und Verdünnungswärme der Säure in den benutzten Konzentrationen ist dabei (A letzte Spalte) in Abzug gebracht. In Abb. 2 und 3 sind die

(gemessenen und korrigierten) Temperaturanstiege zweier Versuche abgebildet, bei denen die für die Lösungs- und Verdünnungswärme abzuziehende Korrektur gestrichelt (nach links verschoben) eingezeichnet

Abb. 2.

Abb. 3.

Abb. 2. Temperaturanstieg beim Eindringen von Valeriansäure. Versuch 2, Tabelle VII. $\times \times \times \times$ gemessener Temperaturanstieg, $\cdots\cdots\cdots$ korrigierter Temperaturanstieg Th $\cdots\cdots$ Thermostatentemperatur, $-\cdots-$ Temperaturanstieg durch Lösungs- und Verdünnungswärme der Valeriansäure, $\uparrow$ Einfüllen der Säure.

Abb. 3. Vers. 5, Tab. VII. Bezeichnung wie Abb. 2.

ist. Man sieht wie bei dem eigentlichen Versuch, hierdurch verursacht, die Temperatur unmittelbar nach Einfüllen der Säure steil ansteigt, der Anstieg sich dann aber weniger steil fortsetzt, ohne daß, wie die Milchsäurekontrollen ergeben, während dieser Zeit eine nennenswerte Milchsäurebildung statthat.

Die Valeriansäure wird aus einer Pipette von beistehender Form mit Wasserstoff herausgedrückt.

Abb. 4. Gekrümmte Pipette zum Einfüllen der Valeriansäure und des Essigesters.

Die Abmessung des Flüssigkeitsvolumens der Valeriansäureaufschwemmung in der Pipette sowie der Gehalt der sich schnell entmischenden Emulsion konnte einen Fehler von 10% enthalten. Doch hat dies für die Korrektur der Lösungswärme einen ganz unbedeutenden Einfluß. Es ergab sich bei Vermischung von 2 ccm 15proz. Emulsion mit 65 ccm Ringertlösung 1,8 cal, bei Vermischung von 20proz. Emulsion 2,4—2,6 cal. Diese Beträge sind bei der Calorienzahl der Tabelle in Abzug gebracht und sie entsprechen den gestrichelten Temperaturanstiegen auf den Kurven. Die Valeriansäure stört die Aldehydbestimmung nicht. Zwar ergibt sich in größeren Konzentrationen ein Jodfehler, der aber bei der kleinen Menge, die beim Eindampfen des alkoholischen Extrakts zurückbleibt, kaum in Betracht kommt. Erst als die fünffache Menge Valeriansäure, wie sie pro Milchsäurebestimmung in dem Ausgangsmaterial vorhanden ist, zu einer Muskelmenge hinzugefügt wurde, ergab sich ein Jodfehler von 0,5—0,8 ccm. Der größte Fehler, der also in einer Bestimmung auftreten kann, 0,15 ccm, macht nur 2—3% der jeweils bestimmten Milchsäure aus.

Tabelle VII.

Wärmebildung beim Eindringen von Valeriansäure in den Muskel (mit Milchsäurekontrolle).

A. Wärmeversuche.

Nr.	Datum	Temp. Grad	Zahl der Frö- sche	Ge- wicht Mus- keln g	Ringer- lösung ccm	2 ccm Vale- rian- säure Vol.-%	Dauer d. Vor- periode	Ver- suchs- dauer nach Zusatz	Temp.- Anstieg Grad	Was- ser- wert	cal. nach Abzug der Ver- dünnungs- wärme
1.	3. X.	20	2	27,8	37,5	15	1 ^h 30'	50'	0,094	77	6,4
2.	12. X.	20	2	26,1	42	15	1 ^h 40'	3 ^h 30'	0,1565	78	10,4
3.	24. XI.	14	2	29,0	38	20	1 ^h 50'	3 ^h 50'	0,184	77	11,8
4.	29. XI.	14	2	32,2	47	20	1 ^h 35'	6 ^h 10'	0,166	89	12,4
5.	1. XII.	14	2	32,0	33	20	1 ^h 30'	3 ^h 40'	0,151	80	9,7

B. Milchsäureversuche.

Nr.	ver- arbeitete Muskeln g	Milch- säure mg	Milchsäure in Muskelmenge des Wärme- versuchs mg	Milch- säure in Ringer- lösung mg	Milchsäure im ganzen %	ab % Milch- säure für Ruhe- minimum und Vorperiode	Milchsäure ge- bildet nach Valeriansäure- zusatz %
1.	12,9	5,75	12,6	3,2	0,057	0,04	0,017
2.	23,4	13,3	14,9	3,8	0,0715	0,045	0,0265
3.	14,3	3,7	8,0	2,5	0,036	0,027	0,009
4.	15,7	6,07	13,0	4,4	0,054	0,025	0,029
5.	14,9	6,1	13,1	4,0	0,0534	0,025	0,0285

C. Berechnung.

Nr.	cal. (korr.) nach Valeriansäure- zusatz	cal.äquivalent für die nach Säure- zusatz gebildete Milchsäure	cal.-Überschuß für Eindringen von Säure	cal. gebildet pro 1 g Muskel	cal.-Überschuß für Eindringen von Säure pro 1 g Muskel
1.	6,4	1,8	4,6	0,23	0,165
2.	10,4	2,6	7,8	0,40	0,30
3.	11,8	1,0	10,8	0,408	0,37
4.	12,4	3,5	8,7	0,384	0,28
5.	9,7	3,4	6,3	0,304	0,20

Daß die Valeriansäure die anaerobe Milchsäurebildung im Muskel nicht nur nicht fördert, sondern sogar hemmt, ergibt sich daraus, daß die berechnete Milchsäureproduktion während der 3—4stündigen Versuchszeit weniger als $\frac{1}{2}$ so groß ist wie unter normalen Umständen bei gleicher Temperatur. Dabei war die Wärmeproduktion bei Versuchsende (mit Ausnahme vielleicht des längsten, aber wegen zu großer Flüssigkeitsmenge weniger genauen Versuchs Nr. 4) noch nicht abgelaufen (siehe den Temperaturverlauf der Kurven). Doch dürfte außer in Versuch 1, der nur 50 Minuten währte, die Hauptwärme, die die Valeriansäure auslöst, in der Versuchszeit gemessen sein. Diese Größe, etwa 0,3 cal. pro 1 g Muskel, ist nun keineswegs unbedeutend. Es ist nicht viel weniger als die Hälfte der Wärme, die bei kompletter

tetanischer Ermüdung des Muskels auftritt. Da nun nur die Hälfte der Kontraktionswärme für die in Frage stehende Reaktion in Betracht kommt, entspricht also die Wärme annähernd der, die beim tetanischen Ermüdungsmaximum die Bildung der Milchsäure im Muskel veranlaßt. Es kommt hier nur auf die Größenordnung an, da ja die Konzentration der Valeriansäure im Muskelinnern nicht bestimmt wurde (bei gleichmäßiger Verteilung zwischen Ringerlösung und Muskulatur wäre ihre Konzentration etwa $0,25-0,3\% = 0,025-0,03\text{ n}$, etwas höher als die Konzentration der Milchsäure bei tetanischer Ermüdung). Die Dissoziationskonstante der Valeriansäure ist allerdings nur $1,6 \cdot 10^{-5}$, die der Milchsäure $1,4 \cdot 10^{-4}$. Gleichwohl können wir beide hier als starke Säuren betrachten, weil sie selbst fast keine Dissoziationswärme besitzen und daher bei Neutralisierung mit äquivalenten Mengen dieselbe Neutralisationswärme veranlassen wie starke Säuren. Dieser Umstand ist, wie wir im nächsten Kapitel sehen werden, für die in Frage stehende Reaktion von Bedeutung.

Um nachzuweisen, daß es sich bei der gemessenen Wärmetönung um eine spezifische Säurewirkung handelt, mußte das Ausbleiben der Wärme beim Eindringen neutraler Substanzen gezeigt werden. Geeignete Stoffe zu finden, ist nicht leicht, weil die gewöhnlichen permeierenden Substanzen, Alkohole, Aldehyde, Urethane usw., starke Milchsäurebildung hervorrufen. Brauchbar erwies sich Essigester. Allerdings ist eine langsame Spaltung desselben in Wasser nicht zu vermeiden. Die benutzte wässrige Emulsion (15 proz.) wurde zunächst mit Natronlauge gegen Phenolphthalein neutralisiert. Viel neue Essigsäure wird in der Versuchszeit offenbar nicht abgespalten; das vorhandene Natriumacetat ist unschädlich. Die Muskeln, die schon durch recht schwache Essigsäure in Starre verfallen, zeigen in Gegenwart des Esters keine Veränderung. Auch der Essigester stört die Milchsäurebildung nicht,

Abb. 5. Temperaturanstieg beim Eindringen von Essigester.
 × × × gemessener Temperaturanstieg, --- korrigierter Temperaturanstieg, Th Thermostatentemperatur, --- Lösungs- und Verdünnungswärme des Essigesters.

ruft keine Milchsäureproduktion im Muskel hervor, sondern unterbricht sie vielmehr. Er hat eine noch größere Lösungs- und Verdünnungswärme als die Valeriansäure, die ebenfalls in der folgenden Tab. VIII in Abzug gebracht und in Abb. 5 gestrichelt angegeben ist. Beim Eindringen des Essigesters in den Muskel findet nun ebenfalls eine gewisse durch Milchsäure nicht gedeckte Wärmeproduktion statt. Sie ist aber bei gleichen Mengenverhältnissen nur etwa $\frac{1}{3}$ so groß wie bei der Valeriansäure, nämlich 0,1 cal. pro 1 g Muskel. Es liegt nahe, diese geringe

Wärme teils auf Spaltungswärme des Esters, teils auf die Reaktionswärme abgespaltener Essigsäure im Muskel zu beziehen. Jedenfalls

ergibt sich ein so beträchtlicher Unterschied gegenüber der Valeriansäure, daß eine spezifische Säurewirkung nicht zweifelhaft ist. Bei Verdünnen von 2 ccm 15 proz. Emulsion von Essigester mit 65 ccm Ringerlösung wurden 4,4—4,5 cal. gebildet.

Tabelle VIII. Wärmebildung beim Eindringen von Essigester.

A. Wärmeversuche.

Nr.	Datum	Temp. Grad	Zahl der Frösche	Gewicht g	Ringer- lösung ccm	Dauer der Vor- periode	Vers.- Dauer nach Zusatz	Temp.-An- stieg, nach Abzug der Verdün- nungswärme Grad	Wasser- wert	Calorien nach Abzug der Ver- dünnungs- wärme
1	15. XI.	20	2	31,3	36	1 ^h 45'	3 ^h 20'	0,065	78	5,1
2	9. XII.	14	2	27,8	40	1 ^h 45'	3 ^h 20'	0,042	78	3,28

B. Milchsäureversuche.

Nr.	Verarbeitet Muskeln g	Milchsäure mg	Milchsäure in Muskelmenge d. Wärmevers. mg	Milchsäure in Ringer- lösung mg	Milchsäure im ganzen %	ab % Milch- säure für Ruhe- minimum und Vorperiode	Milchsäure gebild. nach Esterzusatz %
1	15,15	6,25	12,8	4,6	0,0556	0,045	0,0106
2	12,8	2,96	6,40	1,84	0,0297	0,025	0,005

C. Berechnung.

Nr.	Cal. korr. nach Esterzusatz	Cal.-Äquivalent für die nach Zusatz ge- bildete Milchsäure	Cal.-Überschuß für Eindringen d. Esters	cal. gebildet für 1 g Muskel	Cal.-Überschuß für Eindringen d. Esters pro 1 g Muskel
1	5,1	1,3	3,8	0,165	0,12
2	3,18	0,53	2,75	0,118	0,10

Die Versuche dieses Abschnittes stehen, wie man sieht, in starkem Gegensatz zu den oben (Kapitel IIb) erwähnten mit zerschnittener Muskulatur. Dort fand sich, daß die Milchsäure überhaupt nicht meßbar mit dem zerschnittenen Muskel reagiert, dieser sich vielmehr wie eine Salzlösung verhielt. In der Tat erhält man z. B. wenn man Milchsäure zu zerschnittener Muskulatur in Phosphatlösung zusetzt, pro 1 g Milchsäure 23 cal., ähnlich wie bei reiner Phosphatlösung; suspendiert man den Muskel in Natriumchloridlösung, erhält man etwa 15 cal., was wohl zum großen Teil durch den Phosphatgehalt der Muskulatur bedingt sein wird. Welche Bedingungen für die Milchsäurereaktion im Muskelinnern maßgebend sind, wird sich in dem folgenden Kapitel zeigen.

Kapitel IV. Über die Dissoziationswärme des Eiweißes.

a) Neutralisationswärme der Milchsäure in anorganischer Lösung.

Um sich von dem Umsatz der Milchsäure mit Muskelsubstanzen nach der Kontraktion und den dabei auftretenden Wärmetönungen eine Vorstellung zu machen, hat man meist die Neutralisation mit

Bicarbonat als Schema herangezogen, einmal weil dies tatsächlich im Muskel vorhanden ist, zweitens wegen der naheliegenden Vermutung, daß bei einer ähnlichen Wasserstoffzahl und ähnlichen Pufferwirkungen auch andere Substanzen, vor allem anorganisches und organisches Phosphat und Muskeleiweiß, Reaktionswärmen von ähnlicher Größe hervorrufen würden. Es wird sich zeigen, daß diese Annahme hinsichtlich des Eiweißes völlig fehl geht und daß durch das Ergebnis des vorliegenden Kapitels ein sehr wesentlicher, ich möchte glauben ein entscheidender Schritt zur Aufklärung der uns beschäftigenden Umsatzwärme der Milchsäure gemacht wird. Da es uns nicht auf ein Schema, sondern die tatsächlichen Vorgänge ankommt, ist zunächst zu fragen, welchen Umfang der Umsatz mit Carbonat im besten Fall annehmen kann. Der Carbonatgehalt der Froschmuskeln ist nicht immer gleich. *Fletcher* und *Brown* fanden Unterschiede im Sommer und im Winter; der von ihnen gefundene Gehalt an präformierter Kohlensäure in der ganzen Schenkelmuskulatur ist meist erheblich höher als der von mir an Sartorien bestimmte¹⁾. Der Kohlensäuregehalt der Sartorien wurde nach der *Warburg*schen Methode durch Ansäuern mit 20 proz. Phosphorsäure am Barcroftmanometer bestimmt. Ich erhielt im September an frischen Sartorien von 4 verschiedenen Fröschen auf 1 g Muskel 0,085; 0,095; 0,108; 0,138 ccm $\text{CO}_2 = 0,17\text{—}0,27 \text{ mg}^2$). Nach maximaler Ermüdung mit Einzelreizen enthalten die Sartorien nur noch einen ganz geringen Bruchteil hiervon, während gleichzeitig etwa 3,5 mg Milchsäure auf 1 g Muskel gebildet sind. Diese könnte nach der Gleichung

1,7 mg Kohlensäure austreiben. Es ist aber nur etwa $\frac{1}{10}$ der dazu nötigen Kohlensäure vorhanden. Die hier zur Verfügung stehende Menge ist von verschiedenen Autoren ganz bedeutend überschätzt worden. Da nun die Wasserstoffzahl des frischen Muskels nach *Pechstein*³⁾ und *Parnas*⁴⁾ 7,4—7,6, die des maximal ermüdeten etwa 6,9 ist, NaHCO_3 aber ein p_{H} 8,3 besitzt (KHCO_3 wohl noch etwas alkalischere Reaktion), so ist anzunehmen, daß die Kohlensäure nur

¹⁾ Journ. of physiol. **48**, 177. 1914. Ich möchte fast glauben, daß die bedeutenden Beträge Kohlensäure, die bei diesen Autoren von Froschschenkeln während 24—48 Stunden in Stickstoff abgegeben wurden, insbesondere bei gleichzeitiger Anwesenheit von $\frac{1}{10}$ -Salzsäure, — bis zu 160 Vol.-Proz. der Muskeln (Tabelle S. 200) —, zu einem erheblichen Teil gar nicht aus der Muskulatur, sondern aus den Knochen stammen, was übrigens an ihren Schlußfolgerungen nichts ändert.

²⁾ Beim Ansäuern mit verdünnter Milchsäure — etwa 0,3—0,4% — wird ebensoviel CO_2 ausgetrieben wie mit 20% Phosphorsäure, in Übereinstimmung mit dem folgenden.

³⁾ Biochem. Zeitschr. **68**, 140. 1914.

⁴⁾ Biochem. Zeitschr. **116**, 59. 1921.

zum geringsten Teil als Alkalicarbonat vorhanden ist, im übrigen teils frei gelöst, teils an Eiweiß locker gebunden. Die Wärmetönung der angeführten Reaktion hat *Hill* zu 27 cal. pro 1 g Muskel bestimmt¹⁾. Ich fand bei Neutralisierung mit äquivalenten Mengen etwa dieselbe Größe, bei Überschuß von Bicarbonat sehr viel weniger, bis zu 8 cal. herab.

Größer ist der Gehalt des Muskels an Phosphaten. Nach *Laquer*²⁾ enthalten die Froschmuskeln etwa 0,3% anorganische Phosphorsäure. Gleichwohl kommt nur ein Teil hiervon für den Umsatz

in Betracht, da ja p_{H} maximal nur von 7,5—6,9 verschoben wird. p_{H} 7,5 entspricht nach *Michaelis* etwa einem Gemisch von 8,6 ccm Na_2HPO_4 + 1,4 ccm NaH_2PO_4 , 6,9 dagegen 6,2 Na_2HPO_4 + 3,8 NaH_2PO_4 . Mithin wird schon durch 2,4 ccm äquivalenter HCl oder auch Milchsäure auf 10 ccm Phosphat die Reaktion bis zu der des total ermüdeten Muskels verschoben; $m_{/33}$ -Phosphat (entsprechend 0,3% H_3PO_4) wird somit durch etwa $\frac{1}{4}$ der äquivalenten Menge Milchsäure von der Reaktion des frischen auf die des maximal ermüdeten Muskels gebracht. Dies entspräche etwa 0,07% Milchsäure, also $\frac{1}{4}$ — $\frac{1}{5}$ der gesamten bei der Ermüdung gebildeten. Die Rechnung ist nicht genau, weil das Gemisch von *Michaelis* aus Na_2HPO_4 + NaH_2PO_4 besteht; für die Betrachtung im Muskel aber das System K_2HPO_4 + KH_2PO_4 zugrunde gelegt werden mußte.

Für die Reaktion $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{HCl} = \text{NaH}_2\text{PO}_4 + \text{HCl}$ fand ich (bei Überschuß von Phosphat) für 2 ccm n-HCl 3,45 cal., d. h. pro 1 Mol 1725. Genau soviel berechnet sich nach dem Chemikerkalender aus der Summe von

Für die Reaktion $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{HL} = \text{NaL} + \text{NaH}_2\text{PO}_4$ in äquivalenten Mengen bzw. Überschuß von Phosphat fand ich ebensoviel, nämlich durchschnittlich 19 cal. pro 1 g Milchsäure, was pro Mol 1700 cal. ergibt.

Nachdem diese Wärmetönungen von einer viel zu kleinen Größenordnung sind, ist an die Möglichkeit einer Adsorptionswärme zu denken. 2 ccm 10 proz. Milchsäure wurden zu 4 g Tierkohle in 67 ccm destilliertem Wasser gegeben. Hierbei wurde von 0,2 g Milchsäure etwa 0,13 g adsorbiert und es ergab sich pro 1 g Säure 16,5 cal., nach Abzug der Verdünnungswärme etwa 12 cal., also nur ein ganz geringfügiger Betrag.

¹⁾ Ergebn. d. Physiol. **15**, 340, insbesondere 371. 1916.

²⁾ Zeitschr. f. physiol. Chem. **93**, 60. 1914.

b) *Neutralisationswärme der Milchsäure in eiweißhaltigen Flüssigkeiten.*

Wenn man Milchsäure zu genuinen, phosphat- und carbonathaltigen Eiweißlösungen setzt, Blutserum, Hefeextrakt, Eiereiweiß, Muskelpreßsaft, zeigt sich sofort, daß die Wärmetönung erheblich größer ausfällt, als durch den Umsatz mit anorganischen Salzen erklärbar ist. Mit frischem Pferdeserum ergibt sich 50—60 cal. (mit Ochsen Serum weniger), mit Blut 80—90 cal., mit Eiereiweiß 60 cal., mit neutralisiertem Muskelpreßsaft 67 cal. usw. Es lohnt nicht die zahlreichen derartigen Messungen anzuführen, nachdem das Prinzip mit einfacheren Systemen klargestellt werden konnte und obendrein damit erheblich größere Wärmetönungen erzielt sind. Es ist klar, daß der Carbonat- und Phosphatgehalt dieser Flüssigkeiten störend wirkt, indem er einen Teil der Säure beansprucht und die durch Eiweiß bedingte Wärmetönung herabsetzt. Doch konnte schon mehreres aus diesen Messungen entnommen werden. Das Verhältnis der Konzentration des Eiweißes zu der der zugefügten Milchsäure spielte eine große Rolle: Wurden 60 ccm Serum mit 2,2 ccm 7proz. Milchsäure versetzt, ergaben sich 47 cal. pro 1 g Milchsäure, geschah es mit 3,5% Milchsäure, erhielt man 59 cal. Wurde Hühnereiweiß 1 : 1 verdünnt, sank bei gleichem Milchsäurezusatz die Wärmetönung von 61 cal. auf 41 cal. Wurde andererseits Pferdeserum im *Faustschen* Apparat eingedampft, so stieg beim Eindampfen auf die annähernd 3fache Konzentration die Wärmetönung pro 1 g Milchsäure bis zu 106 cal., bei noch etwas höherer Konzentration auf 114 cal. Übrigens blieb beim Säurezusatz das Serum vollständig klar und falls bei manchen Eiweißlösungen, z. B. Eiereiweiß oder Caseinlösung Fällungen auftraten, so verringerte sich offensichtlich die Wärmetönung dadurch, daß ein Teil der Milchsäure im Niederschlag weggebunden wurde. Als konzentriertesten Eiweißextrakt verwandte ich Aufschwemmungen von Trockenhefe. Wurde Milchsäure direkt zu der Aufschwemmung, deren Wasserstoffzahl etwa 5—6 ist, zugegeben, traten nur 25 cal. auf; wurde soviel n-Natronlauge zugefügt, daß die Reaktion sich am Umschlagspunkt des Phenolphthaleins befand ($p_H = 8,2$), wurden über 100 cal. erhalten, während infolge der starken Pufferwirkung die Reaktion sich kaum erkennbar verschob. Für diesen Unterschied konnte der Phosphatgehalt der Hefe mitverantwortlich sein, weil das Phosphat bei p_H 6 eine viel stärkere Pufferwirkung besitzt als bei p_H 8, und daher von einer bestimmten Menge zugefügter Säure viel mehr für sich beansprucht; es lag aber nahe, noch an eine andere Ursache zu denken. Das Prinzip, daß den Wärmetönungen zugrunde liegt, wurde nun durch Versuche mit Aminosäuren geklärt, deren Resultate sich dann auf isolierte Eiweißkörper (frei von basischen Salzen) vollständig übertragen ließen. Mit diesen erhalten wir zugleich die größten Beträge an Wärme, die in wässriger Lösung mit Eiweiß

erzielbar sind. Wir werden sehen, daß wir nichts anderes messen als die (umgekehrte) Dissoziationswärme des Eiweiß, die noch nie bestimmt, ja deren Vorhandensein, soweit mir bekannt, noch nie ernstlich in Betracht gezogen ist.

c) *Die Dissoziationswärme der Aminosäuren.*

Neutralisieren wir eine $\frac{n}{2}$ -Glykokollösung (3,75proz.) mit soviel Natronlauge, daß die Wasserstoffzahl 8,8 wird, wozu wir etwa $\frac{1}{10}$ der äquivalenten Menge Natronlauge benötigen und fügen jetzt soviel Milchsäure oder auch Salzsäure hinzu, daß die Reaktion sich nur wenig, z. B. bis p_H 8,4, verschiebt, so erhalten wir bei diesem letzteren Vorgang knapp 130 cal. pro 1 g Milchsäure (bei 20°). Eine ebenso große Wärmetönung erhalten wir auch mit gleich neutralisiertem Alanin oder (übersättigter) Leucinlösung und sicherlich mit allen Aminosäuren von ähnlichen Dissoziationsverhältnissen. Da der isoelektrische Punkt des Glykokolls bei p_H 6,088 liegt¹⁾ und auf der alkalischen Seite desselben keine Reaktion zwischen der Aminogruppe und dem H-Ion sich abspielt, verhält sich das Glykokoll wie eine gewöhnliche schwache Säure und wir können den Vorgang formulieren als

(G = Glykokollanion; L = Milchsäureanion)

Die Milchsäure können wir als vollständig dissoziiert auffassen, weil sie keine meßbare Dissoziationswärme zeigt. Die einzige Reaktion, die zu einer Wärmetönung Anlaß gibt, ist somit $\text{H}' + \text{G}' = (\text{GH})$. Wir erhalten also die umgekehrte Dissoziationswärme des Glykokolls für die Säuredissoziation (da die Dissoziationswärme selbst negativ ist und der Ausdruck „negative Dissoziationswärme“ daher mißverständlich, spreche ich von der umgekehrten Dissoziationswärme, also einer Entionisierungswärme). Die Dissoziationswärmen der Aminosäuren sind noch nie gemessen und für die Säuredissoziation liegen auch keine Daten vor, aus denen sie berechnet werden könnten. Dies könnte bekanntlich nach der *van't Hoff*schen Isochorengleichung geschehen

$$\frac{1}{K} \cdot \frac{dK}{dT} = \frac{-Q}{RT^2},$$

wenn K für 2 Temperaturen bekannt ist. Dies ist nun für die Säuredissoziationskonstante der Aminosäuren nicht der Fall, wohl aber zufällig für die Basendissoziationskonstante des Glykokolls nach den Messungen von *Winkelblech* und *Walker* bei 25° und 60°. Aus den beiden Werten

$$K_{b \ 25^\circ} = 2,66 \cdot 10^{-12} \quad \text{und} \quad K_{b \ 60^\circ} = 28 \cdot 10^{-12}$$

¹⁾ *Sørensen* in *Asher-Spiros Ergebn.* **12**, 501. 1912.

berechnet sich nach *Lundén*¹⁾ die Dissoziationswärme — 13 000 cal. (bei 40°). Ich maß die Wärme direkt, indem zu 70 ccm mit Salzsäure versetzter Glykokollösung von $p_H = 3$ (90 ccm $n/2$ -Glykokollösung + 10 ccm n-HCl) 2 ccm n-NaOH zugesetzt wurde. Es ergaben sich 28,0 cal., oder korrigiert für die Verdünnungswärme der Salzsäure, —13 500 cal. als molare Dissoziationswärme bei 20°. Da ein ähnlicher Beleg für die Wärme der Säuredissoziation nicht möglich ist, können wir das Resultat nach der Formel prüfen: Neutralisationswärme (q_{neutr}) = Dissoziationswärme (q_{diss}) — Dissoziationswärme des Wassers (q_w) oder: $-q_w = q_{\text{neutr}} - q_{\text{diss}}$. q_w ist bei 20° —13 700 cal. Fügen wir also zu unserer Glykokollnatriumlösung, die auf p_H 8,8—8,6 gepuffert ist, einmal HCl, ein anderes Mal NaOH hinzu, so erhalten wir im ersten Fall $-q_{\text{diss}}$, im zweiten Fall q_{neutr} (wir neutralisieren die schwache Säure Glykokoll). Beides zusammen muß $-q_w$ sein, was ja gleich der Neutralisationswärme starker Säuren mit starken Basen ist. In der Tat haben wir nichts anderes getan, als nach Zusatz von HCl und nachherigem Zusatz von NaOH das Glykokollgemisch wieder auf seinen Ausgangszustand zurückzuführen unter Vermehrung seines NaCl und HOH-Gehalts nach der Gleichung

Die mit Milchsäure gefundene Reaktionswärme 133 cal. pro 1 g Säure, nach Abzug der Verdünnungswärme 129 cal., entspricht einer molekularen Dissoziationswärme des Glykokolls von —11 550 cal. Außerdem wurde diese in 2 Versuchen mit Salzsäure bestimmt und ergab (nach Korrektur für die Verdünnungswärme der Salzsäure) —11 450 und —11 300 cal. Wurde nun andererseits zu dem Glykokollgemisch von p_H 8,6—8,8 NaOH ohne stärkere Verschiebung der Reaktion zugefügt, ergab sich in 2 Versuchen +2900 und +2800 cal. als Neutralisationswärme. Dabei wurde im zweiten Versuch so verfahren, daß zu demselben Gemisch zuerst 2 ccm n-HCl, dann 2 ccm n-NaOH gegeben wurde, wobei im ersten Fall 23 cal. (korrigiert für Verdünnungswärme), im zweiten Fall 5,7 cal. auftraten. Also umgekehrte Dissoziationswärme = 11 500, Neutralisationswärme = 2800; Summa 14 100 cal. In der Tat erhalten wir fast genau die Dissoziationswärme des Wassers, wenn auch ein bißchen viel zu. Ein solcher Überschuß von 3—5% trat übrigens bei mehreren Versuchen dieses Abschnittes auf, während sich die Neutralisationswärme des Wassers sowohl bei Überschuß von Natronlauge wie bei Salzsäure fast genau zu 13 700 cal. ergab. Dies liegt vielleicht an nicht ganz genauer Bestimmung des Wasserwertes bzw. der spezifischen Wärme, die ich nach einer Messung

¹⁾ *Lundén*, Affinitätsmessungen an schwachen Säuren und Basen. Chemisch-technische Vorträge **14**, 85, siehe auch S. 68. 1908 (F. Enke).

an Alaninlösung = 0,97—0,98 setzte, oder auch an dem Kohlensäuregehalt der Natronlauge, wodurch das System nicht mehr ganz so reversibel ist, wie es in der Betrachtung vorausgesetzt wurde. Da nun auch die Abmessungen in der Pipette des Wärmegefäßes leicht auf 2% ungenau sein können und Präzisionsmessungen hier nicht in Betracht kamen, habe ich der Ursache dieser geringen Abweichung nicht weiter nachgeforscht. — Die gleiche Kontrolle können wir nun auch für die Basendissoziation des Glykokolls anstellen. Da sich die Dissoziationswärme zu —13 500 cal. ergibt, sollte die Neutralisationswärme nur eine äußerst geringfügige sein. In der Tat ergab sich bei Zusatz von 2 cem n-HCl zu Glykokoll-HCl-Gemisch von p_H 3,5 nur 2,6 cal., also eine Neutralisationswärme (korrigiert für Verdünnungswärme) von 900 cal. pro Mol. Die Summe ist 14 400 cal., die Dissoziationswärme des Wassers mit einem geringen Überschuß.

Nunmehr ist klar, daß wir eine Reaktionswärme von Säure mit einem Glykokollpuffergemisch von angegebenem Umfang: 130 cal. pro 1 g Milchsäure, nur erhalten können, wenn wir uns ganz auf der alkalischen Seite des isoelektrischen Punktes befinden. Denn überschreiten wir diesen beim Säurezusatz, so gelangen wir in das Bereich der Basendissoziationswärme, wo die Säure nur die minimale Neutralisationswärme von 900 cal. pro Mol hervorruft. Auch dies läßt sich leicht feststellen. Setzen wir z. B. zu einem $n/2$ -Glykokollgemisch von der Reaktion $p_H = 8,0$ 2,5 cem 7proz. Milchsäure, so wirkt die Glykokolllösung nicht mehr puffernd auf der alkalischen Seite, die Wasserstoffzahl fällt auf etwa 3,7 und wir erhalten statt 130 cal. nur 22 cal. Die Wärmetönung ist also an die Pufferwirkung gebunden, was schon oben bei den Eiweißlösungen ersichtlich war. Man könnte den Einwand erheben, daß das hier untersuchte Reaktionsgebiet zu weit nach der alkalischen Seite läge, um für den Muskel in Betracht zu kommen. Das ist aber lediglich die Folge davon, daß der isoelektrische Punkt des Glykokolls bei 6,088, also dicht am Neutralpunkt liegt, und wir nicht so hoch konzentrierte Glykokollösungen verwandten, daß sie noch zwischen p_H 8 und 7 puffern können. Der isoelektrische Punkt der meisten Eiweißkörper liegt weit mehr nach der sauren Seite verschoben¹⁾. Der von Serumalbumin z. B. bei $p_H = 4,7$, der von Serumglobulin bei p_H 5,4. In der Tat können wir mit diesen Körpern schon zwischen p_H 8 und p_H 7,5 (und wohl auch, was ich nicht geprüft habe, noch etwas dichter am Neutralpunkt) die gleichen Resultate erzielen, wie wir im folgenden Abschnitt sehen werden.

Ausführung der Versuche. Zu allen Messungen diente dasselbe dreiwandige Dewargefäß, das auch in den anderen Kapiteln benutzt wurde. In der in ihm hängenden Pipette befand sich die zuzusetzende Säure (oder Base). Erst nachdem

¹⁾ Siehe Höber, Physikalische Chemie der Zelle und Gewebe. 4. Aufl. 1914. S. 330.

das Gefäß zum Temperatenausgleich eine gute Stunde im Thermostaten bei 20° (in einigen Versuchen 22°) gehängt hatte, wurde der Inhalt mit Wasserstoff herausgedrückt. Als Pipette diente teils eine gebogene von ähnlicher Form wie Abb. 4 von 2,5 cm, teils eine gerade von 2 cm. Um das Auslaufen von Säure vor dem Versuch zu verhindern, war nicht nur das obere Ende mit Schlauchquetschhahn verschlossen, sondern auch die Spitze mit etwas Hahnfett verschmiert. Nach dem Herausdrücken mischt der durchströmende Wasserstoff die Lösung sehr schnell und gründlich, was durch Umschwenken des Gefäßes befördert wurde. Der gemessene Temperaturanstieg brauchte nicht korrigiert zu werden. Die eingehängten Säure- (Basen-)lösungen waren vorher gegen $\frac{n}{10}$ -Natronlauge titriert. Von Milchsäure wurde meist 1 g käuflicher Säure auf 10 cm verwandt, was einer 7proz. Konzentration in Bezug auf reine Milchsäure entspricht. Die Aminosäurelösung im Dewargefäß war im Überschuß vorhanden, meist $\frac{n}{2}$ -konzentriert. Sie wurde durch Zusatz von n-Natronlauge bzw. n-HCl unter Zugrundelegung der *Sörensenschen* Übersichtstabelle ¹⁾ auf eine bestimmte Wasserstoffzahl eingestellt und dies durch Indikatoren kontrolliert. Die spezifische Wärme wurde nach dem Mischungsverfahren bestimmt. Die Apparatur, in der ein auf 100° erwärmtes Stück Blei von vorher bestimmter spezifischer Wärme in das Calorimeter mit der Versuchslösung herabgelassen wird, war nach dem Praktikum von *Roth* ²⁾ angefertigt. Hiermit wurde auch die spezifische Wärme der Eiweißlösungen des folgenden Abschnittes bestimmt. Für die Verdünnungswärme der Milchsäure wurde nach den Bestimmungen des Kap. I eine Korrektur angebracht (für die Verdünnung von 2 cm 7proz. Säure auf 70 Wasser 4 cal).

Tabelle IX.

„Neutralisierungswärme“ der Milchsäure durch aminosäure Salze.

Nr.	Benutzte Aminosäure	Molare Konzentration	p _H		Zugesetzte Menge titrier. Säure g	Gemessener Temp.-Anstieg Grad	Wasserwert	cal. gemessen	Cal. pr. 1 g Milchs. (n. Abzug d. molarer Dissoziationswärme)	Entspricht
			vorher	nachher						
1.	Glykokoll	0,5	8,85	8,3	0,173	0,303	77	23,3	131	— 11 800
2.	Glykokoll	0,5	8,8	8,3	0,182	0,306	76	23,3	124	— 11 150
3.	Glykokoll	0,9	8,9	8,7	0,175	0,317	74	23,5	130	— 11 700
4.	Alanin	0,5	8,9	8,4	0,145	0,250	80	20,0	134	— 12 100
5.	Alanin	0,5	8,9	8,4	0,140	0,221	83,5	18,45	128	— 11 500
6.	Alanin	0,5	8,9	8,4	0,136	0,231	77	17,8	127	— 11 400
7.	Leucin	übersätt.	9,0	8,5	0,077	0,147	71,5	10,5	132	— 11 900
8.	Leucin	„	9,2	?	0,070	0,127	76,5	9,7	134	— 12 100

Durchschnitt 130 — 11 700

Da die Differenz zwischen den 3 geprüften Aminosäuren in die Fehlergrenze fällt, erhalten wir somit als Durchschnitt für die Neutralisierung von 1 g Milchsäure 130 cal., für die Dissoziationswärme der Aminosäuren — 11 700, ein Wert, der immerhin auf Grund der Versuche der Tab. X um einige Prozent zu groß sein wird. Für die Versuche der Tab. X wurde stets die gerade Auslaufpipette von 2,0 cm

¹⁾ a. a. O., S. 436.²⁾ W. A. Roth, Physikalisch-chemische Übungen. 2. Aufl. Voss, Leipzig. S. 71.

benutzt. Für die Verdünnungswärme von 2 cem n-HCl auf 60 cem Lösung wurde pro Mol Salzsäure 400 cal. in Abzug gebracht, für die Natronlauge keine Korrektur.

Tabelle X.
Dissoziations- und Neutralisationswärme von Glykokoll ($n/2$).

Nr.	p_H		Zusatz	Gehalt des Zusatzes an Millimol	Gemessener Temp.-Anstieg Grad	Wasserwert	cal. gebildet	1)	Berechnete molare Wärme (korr. für Verdünnungswärme)
	vorher	nachher							
1.	8,8	8,25	HCl	2,00	0,304	78	23,7	S D	— 11 450
2.	8,3	8,8	NaOH	2,05	0,080	75,5	6,05	S N	+ 2 900
3.	8,9	8,4	HCl	2,05	0,313	76,5	23,9	S D	— 11 300
4.	8,4	8,9	NaOH	2,02	0,374	78	5,7	S N	+ 2 800
5.	3,0	3,3	NaOH	2,06	0,357	78	27,8	B D	— 13 500
6.	3,7	3,2	HCl	2,00	0,034	77	2,6	B N	+ 900

Die ungewöhnliche Größe der (negativen) Dissoziationswärme der Aminosäuren, die fast alle bekannten übertrifft, beruht ohne Zweifel auf der Umlagerung der freien Säure zu einem Komplexsalz:

oder genauer, in der Schreibweise Werners:

Diese letztere Formel ist insbesondere durch die Arbeit von Löffler und Spiro gut begründet³⁾.

Auch Hantzsch hat bei seinem Studium der Pseudosäuren, die auf Grund einer ähnlichen Umlagerung bei der Abspaltung freier Säure aus ihrem Salz entstehen, ein ungewöhnliches Anwachsen der Dissoziationskonstanten mit der Temperatur festgestellt⁴⁾, was nach der van t'Hoff'schen Gleichung auf eine große Dissoziationswärme schließen läßt. Die Ursache der großen Dissoziationswärme der Aminosäuren liegt also in der Absättigung erheblicher Restaffinitätsbeträge bei der N . . . H-bildung.

d) Die Neutralisation der Milchsäure durch isoliertes Eiweiß.

Die mit Aminosäuren gewonnenen Erfahrungen lassen sich nun vollständig auf konzentrierte Eiweißlösungen, die frei von basischen Salzen sind, übertragen. Der sonstige Salzgehalt scheint von keinem erheblichen

1) B D = Basendissoziationswärme; B N = Basenneutralisationswärme;
S D = Säurendissoziationswärme SN = Säurenneutralisationswärme.

2) Meyer-Jacobson, Lehrbuch der organ. Chemie I₂. 2. Aufl. 1913. S. 734.
Willstätter, Berl. Ber. **35**, 585 (1902).

3) Helvetica Chimica Acta. vol. II. S. 533. 1919.

4) Berl. Ber. **32**, 575. 1899.

Einfluß. Die entscheidenden Versuche wurden mit Serumglobulin und Serumalbumin aus Pferdeserum sowie mit Muskeleiweiß aus Pferdefleisch angestellt. Zur Gewinnung des ersteren wurde Pferdeserum zunächst mit dem gleichen Volumen gesättigter Ammonsulfatlösung versetzt, der Globulinniederschlag abgenutscht, ohne ihn zu waschen wieder durch Zugabe von destilliertem Wasser gelöst. Das Filtrat wurde bei 35° mit Ammonsulfat gesättigt, der Albuminniederschlag ebenfalls abgenutscht, mit destilliertem Wasser verrührt und in mehreren Dialysierhülsen kurze Zeit dialysiert, so daß er sich völlig klar dunkelbraun in Wasser löste. Selbstverständlich sind die Eiweißlösungen keineswegs rein und enthalten sehr viel Ammonsulfat (z. B. $\Delta -2,7^\circ$). Dieser Umstand stört aber nicht¹⁾, es ist nur nötig die spezifische Wärme pro Volumeneinheit für jede Lösung zu bestimmen, was mit dem im vorigen Abschnitt angeführten *Rothschen* Apparat geschah. Wird direkt zu 60 ccm einer konzentrierten Globulinlösung, die aus etwa der 7fachen Menge Serum stammt und gegen Neutralrot violett, gegen Methylrot gelb ist (p_H ca. 6) 2 ccm 7proz. Milchsäure zugesetzt, so ergeben sich pro 1 g Milchsäure nur 24 cal. Wurde dagegen vorher $\frac{1}{10}$ Volumen n-Natronlauge zugesetzt, wodurch die Reaktion etwa $p_H = 8,4$ wird, ergab der gleiche Zusatz 141 cal., nach Abzug der Verdünnungswärme 137 cal. pro 1 g Milchsäure. Genau die gleiche Wärmetönung und zwar stets zwischen 141 und 143 cal. wurde noch mit einer anderen Globulinarstellung sowie mit 2 verschiedenen Albuminpräparaten trotz verschiedener Konzentration und sehr verschiedener spezifischer Wärme erhalten und es ist nicht ohne Interesse, daß die Wärmetönung, wenn auch nicht viel, so doch deutlich größer war als bei den Aminosäuren. Sicherer als die unmittelbare Messung selbst, bei der Fehler in der Bestimmung der spezifischen Wärme das Resultat leicht fälschen können, ergibt sich das auch hier aus der Kontrollmessung nach der Formel: $q_{\text{neutr}} = q_{\text{diss}} - q_n$. 60 ccm Albuminlösung, etwa $2\frac{1}{2}$ -fach konzentriert gegenüber Serum, war mit $\frac{1}{20}$ Volumen nNaOH versetzt, wodurch die Wasserstoffzahl dicht bei 8 lag (Neutralrot orange): und ergab dann mit 0,139 g Milchsäure 19,6 cal., pro 1 g 141 cal., was (nach Abzug der Verdünnungswärme) einer Dissoziationswärme des Eiweiß von $-12\ 350$ cal. entspricht, bezogen auf Milchsäure äquivalente. p_H wurde dadurch auf etwa 7,5 verschoben (Neutralrot orangerot). Nachher wurde die Lösung mit 2 ccm n-NaOH versetzt und es ergab sich 2,75 cal., was einer Neutralisationswärme von $+1370$ cal. entspricht. $12\ 350 + 1370$ geben aber $13\ 720$ cal., genau die Dissoziationswärme des

¹⁾ Soweit NH_4 statt Na zur Neutralisation der Säure dient, muß dies allerdings die Dissoziationswärme etwas verringern. Doch gaben weitgehend dialysierte Albuminlösungen keine höheren Wärmebeträge. Im übrigen wird die etwaige Beeinflussung der Dissoziationswärme durch Salzzusatz in einer weiteren Bearbeitung des vorliegenden Gegenstandes genauer geprüft.

Wassers. Da die Neutralisationswärme für die Säuredissoziation bei den Aminosäuren doppelt so groß gefunden wurde wie hier, muß die Dissoziationswärme des Albumins um diesen Betrag, d. h. etwa 10% größer sein wie die der Aminosäuren. Wir haben es, wie man aus der genauen Übereinstimmung der Summe von Dissoziations- und Neutralisationswärme mit der berechneten ersieht, also auch hier mit einem völlig reversibeln System zu tun. Wurde die Albuminlösung nicht mit Natronlauge neutralisiert, erhielt man pro 1 g Milchsäure 86 cal. Die größere Wärme gegenüber dem Globulin entspricht dem Umstand, daß die Albuminlösung weniger sauer als die genuine Globulinlösung ist und der isoelektrische Punkt weiter auf der sauren Seite liegt. Wurde andererseits zu einer genuinen Globulinlösung, zu der bereits 2 ccm 7 proz. Milchsäure hinzugesetzt sind (mit 24 cal. Wärmebildung) nochmal 2 ccm 7 proz. Milchsäure zugesetzt, so trat überhaupt keine meßbare Wärme mehr auf. (p_H 4—5). Da wir uns hier auf der sauren Seite des isoelektrischen Punktes befinden und keine Neutralisationswärme erhalten, folgt, daß die Basendissoziationswärme der Dissoziationswärme des Wassers annähernd gleich, also noch größer als die Säuredissoziationswärme ist, in Übereinstimmung mit dem gleichen Unterschied bei den Aminosäuren. In der Tat bestätigte sich dies mit einer stark dialysierten Albuminlösung, die mit HCl noch etwas mehr angesäuert war (Methylrot rot, Methylorange gelb PH 4,2). Bei Zusatz von 2 cm $\frac{n}{2}$ NaOH ergab sich 13,0 cal. = 13000 cal Basendissoziationswärme; beim Zusatz von $\frac{n}{2}$ HCl 0,65 cal. = 650 cal. Basenneutralisationswärme; zusammen 13650 cal. Doch kommt die Basendissoziationswärme für unser Problem nicht in Betracht.

Diese Versuche wurden mit Muskeleiweiß wiederholt und dies gab fast genau dasselbe Resultat, bemerkenswerterweise sogar eine zwar nur ganz wenig aber doch deutlich größere Dissoziationswärme als die Serumproteine. Hierzu wurde, ähnlich den Angaben von Fürth¹⁾ und Saxl²⁾, Pferdefleisch mit der Fleischmaschine und mit Wiegemeßern zerkleinert und dann mit dem 2fachen Volumen 10 proz. Ammonchloridlösung ausgelaugt und durch Koliertücher leicht abgepreßt. Ein Teil des abgelaufenen „Muskelplasmas“ wurde nach v. Fürth mit Ammonsulfat fraktioniert gefällt. Die Hauptmenge jedoch direkt in Pergamentschläuchen 12 Stunden dialysiert und dann in toto verwandt. Während mit dem fraktioniert gefällten Eiweiß aus verschiedenen Gründen keine genauen Resultate erzielt wurden, gaben 2 verschieden konzentrierte Präparationen des dialysierten Muskelplasmas nach Versetzen mit Natronlauge (2,0 ccm n-NaOH auf 70—80 ccm Eiweißlösung, p_H 8,0 bis 8,3) pro 1 g Milchsäure 144 cal., nach Abzug der Verdünnungswärme

¹⁾ Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmacol. **36**, 231. 1895.

²⁾ Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. **9**, 1. 1906.

140—141 cal. Die Genauigkeit dieser Messungen ließ sich wiederum kontrollieren, indem zu denselben Eiweißlösungen bei einer Wasserstoffzahl von 7,5—8 im Thermostaten 2 ccm n-NaOH zugefügt wurden; hierbei ergaben sich 2,16 und 2,05 cal. Umgerechnet finden wir für das konzentrierte Muskelplasma (spezifische Wärme 0,89) eine Dissoziationswärme pro Milchsäureäquivalent von —12 600 cal., eine Neutralisationswärme von 1080 cal., Summa 13 680 cal. Für das verdünnte Muskelplasma (spezifische Wärme 0,95) eine Dissoziationswärme —12 700 cal., Neutralisationswärme 1025 cal., Summa 13 725 cal., in vorzüglicher Übereinstimmung mit dem theoretischen Wert. Da die Neutralisationswärme hier 1050 cal., bei Serumalbumin 1370 cal. beträgt, ersieht man, daß die Dissoziationswärme hier um die kleine Differenz, d. h. um 2—3% größer ist. Wurde aber andererseits zu dem nicht mit Natronlauge versetzten dialysierten Muskelplasma ($p_H = 6,5$) 2 ccm 8proz. Milchsäure zugesetzt, ergab sich nur 1,5 cal., d. h. pro 1 g Milchsäure knapp 10 cal. Gleichzeitig schlägt die Reaktion vollständig bis zur Rotorangefärbung von Methylorange, also bis zu p_H 4 um und es tritt eine dicke Fällung auf, die sich bei Zugabe einer entsprechenden Menge Natronlauge wieder löst. Wir überschreiten hier also den isoelektrischen Punkt und bewegen uns jetzt im Gebiet der Basendissoziation des Eiweißes. Dieses Gebiet wird jedoch im lebenden Muskel niemals erreicht, da die Wasserstoffzahl, wie oben betont, selbst bei der Starre nur auf etwa 6,5 herabgeht.

Einige Versuche wurden auch mit Casein und Gelatine (letztere bei 30°) angestellt. In beiden Fällen war die Wärme beim Milchsäurezusatz weit geringer. Doch geht daraus nicht sicher hervor, daß die Dissoziationswärmen hier kleiner sind. Bei Zusatz von 2,3 ccm 7proz. Milchsäure zu 60 ccm 8proz. Caseinlösung, enthaltend 4 ccm n-Natronlauge (p_H ca. 8,5) ergaben sich nur 42 cal. pro 1 g Säure. Die Pufferung war ausreichend, p_H nachher etwa 7,0, während der isoelektrische Punkt bei 4,7 liegt. Gleichzeitig entstand aber eine Fällung, nach deren Abfiltrieren man wieder dieselbe Wärmetönung erhielt. Möglicherweise ist die geringfügige Wärme auf die Fällung zu beziehen. Gelatine-lösungen dagegen pufferten sehr schlecht. Eine 10proz. Gelatine mit ungefähr 4 ccm n-NaOH auf 100 ccm (p_H ca. 8,5) schlug bei Zusatz von 0,14 g Milchsäure schon bis etwa p_H 5 um. Hierbei ergaben sich 73 cal. pro 1 g Milchsäure. Tab. XI gibt eine Übersicht über die gemessenen Werte und die Berechnung pro 1 g Milchsäure. In der Tab. XII sind die Versuche zusammengestellt, in denen gleichzeitig die Dissoziationswärme und die Neutralisationswärme für die Säuredissoziation des Eiweißes bestimmt sind.

Tabelle XI.
Wärmebildung bei Zusatz von Milchsäure zu isoliertem Eiweiß.

Nr.	Benutztes Eiweiß	p _H vor- her ca.	p _H nach- her ca.	Milch- säure in g	Tempe- ratur- anstieg Grad C	Spezif. Wärme pro Vol.- Einheit	Wasser- wert	cal. gemess- en	cal. pro 1g Milchs. (n. Abzug der Verdün- nungs- wärme)
1	Albumin	8,3	8,3	0,140	0,263	0,92	75	19,75	137
2	Globulin	8,0	8,0	0,140	0,282	0,915	71	20,00	139
3	Globulin	8,4	8,0	0,136	0,296	0,85	65,5	19,3	137
4	Albumin	8,0	7,5	0,139	0,311	0,81	63,2	19,6	137
5	Globulin	4,5	4	0,14	0,000	0,91	75	0	0
6	Globulin	6	4,5	0,136	0,062	0,845	62	3,85	24
7	Albumin	7	5—6	0,139	0,100	0,81	62	6,2	82
8	Muskeleiweiß	8,2	8,0	0,156	0,310	0,89	71,5	22,2	140
9	Muskeleiweiß	8,3	7,8	0,159	0,302	0,95	76,5	23,1	141
10	Muskeleiweiß	8,0	7,5	0,078	0,164	0,89	66	10,8	139
11	Muskeleiweiß	6,5	4,5	0,156	0,022	0,89	70	1,5	9,8
12	Casein	8,5	7,3	0,168	0,111	ca. 97	70	7,77	42
13	Casein	7,0	6,0	0,084	0,056	ca. 97	70	3,88	42
14	Gelatine	8,5	4,5	0,140	0,118	ca. 96	84	9,9	67

Tabelle XII.
Dissoziationswärme von Eiweiß.

Nr.	Eiweißwert	Zusatz	Gehalt d. Zus. Millimol	Gemess. Temp.- Anstieg	Wasser- wert	cal. gebildet	N ¹⁾ D	Wärme- tönung pro Äquivalent	Daraus Dis- soziationsw. des Wassers
1	Albumin	Milchs.	1,54	0,301°	63,2	19,6	D	— 12 370	13 720
	„	NaOH	2,0	0,043°	64	2,75	N	+ 1 370	
2	Muskeleiweiß	NaOH	2,0	0,031°	70	2,16	N	+ 1 080	13 680
	„	Milchs.	1,73	0,310°	71,5	22,6	D	— 12 600	
3	Muskeleiweiß	NaOH	2,0	0,027°	76	2,05	N	+ 1 025	
	„	Milchs.	1,77	0,302°	76,5	23,1	D	— 12 700	13 725
4	Albumin	NaOH	0,95	0,165°	75	12,35	Bd	— 13 000	
	„	HCl	1,0	0,011°	77	0,85	Bn	+ 650	13 650

Die gemessenen Dissoziationswärmen des Eiweißes, die von gleicher Größenordnung sind und ein völlig identisches Verhalten zeigen, wie die der Aminosäuren, bestätigen die von *W. Pauli*²⁾ vertretene und in neuerer Zeit in noch präziserer Form von *J. Loeb*³⁾ begründete Ansicht, daß sich das Eiweiß gegenüber Säuren und Basen nicht anders wie ein kristalloid gelöster Ampholyt mit einer bestimmten Valenzzahl von

¹⁾ N = Neutralisationswärme, D = Dissoziationswärme. Bd.: Basendissoziationswärme. Bn.: Basendissoziationswärme.

²⁾ Vgl. Kolloidchemie der Eiweißkörper. Dresden 1920.

³⁾ Vgl. zahlreiche Arbeiten im Journ. of gen. physiol. I—III, 1919/1921.

mäßig stark saurem und basischem Charakter verhält. Auf einen Punkt sei besonders hingewiesen: Für Pferdeserumalbumin berechnet *Pauli* (a. a. O. S. 69) eine mittlere Basendissoziationskonstante von $1,57 \cdot 10^{-11}$ bis $1,57 \cdot 10^{-10}$ näher dem letzteren Wert. Nehmen wir $5 \cdot 10^{-11}$, so folgt, da der isoelektrische Punkt von Serumalbumin nach *Michaelis* bei $2 \cdot 10^{-5}$ liegt und für diesen die Gleichung gilt $\frac{ka}{kb} = \frac{[H^+]}{[OH^-]}$ (ka Säure-dissoziationskonstante, kb Basendissoziationskonstante): $ka = 5 \cdot 10^{-11} \times \frac{2 \cdot 10^{-5}}{5 \cdot 10^{-10}} = 10^{-5,7}$. Das Albumin wäre also eine nicht besonders schwache Säure. Die Größe der negativen Dissoziationswärme ist nun zwar nicht einfach reziprok der Stärke der Säure — dies wäre das *Berthelotsche* Prinzip — aber es ergibt sich doch aus den Zusammenstellungen von *Lundén*¹⁾ sowie *Landolt-Börnstein*²⁾, daß sehr große negative Dissoziationswärmen sonst nur bei ganz schwachen Säuren (bzw. Basen) vorkommen. Dort sind überhaupt nur 4 solche schwache Säuren verzeichnet, deren Dissoziationswärme über $-10\,000$ cal. liegt, nämlich Saccharose, Blausäure, Asparagin und die zweite Dissoziationsstufe von Brenzcatechin, dessen Dissoziationswärme allein annähernd so groß wie die hier für Albumin und Globulin bestimmte ist (bei 12° $-12\,100$ cal.). Die Eiweißkörper besitzen demnach die größte Dissoziationswärme, die bisher bekannt ist, und das ist besonders auffällig, wenn sie so starke Säuren sind, wie es nach obiger Rechnung erscheint. Dies macht es außerordentlich wahrscheinlich, daß genau so wie bei den Aminosäuren das aus dem Alkalisalz durch Säure ausgetriebene Protein durch Betätigung von Restaffinitäten zwischen den Amino- und Carboxyl- (bzw. CO-)gruppen seinen sauren Charakter fast vollständig einbüßt, ohne übrigens damit schon unlöslich in Wasser zu werden. Doch folgt weiter nach der *van't Hoff'schen* Gleichung ein enormes Ansteigen der Dissoziationskonstanten mit der Temperatur; und dies könnte für die Löslichkeit von Eiweiß bei verschiedenen Temperaturen von Bedeutung sein. Indes soll uns hier die Theorie dieses Verhaltens nicht weiter beschäftigen, sondern vielmehr die Frage, ob die hier aufgefundene umgekehrte Dissoziationswärme, also die Entionisierungswärme des Eiweißes ausreicht, um die Reaktionswärme der Milchsäure im Muskelinnern zu erklären³⁾. Ich zweifle nicht, daß sie dieser letzten Endes zugrunde liegt,

¹⁾ a. a. O., S. 66 ff.

²⁾ 4. Aufl. 1913. S. 904.

³⁾ Es sei darauf hingewiesen, daß die hier vertretene Anschauung erheblich abweicht von den von *O.v.Fürth* über die Reaktion der Milchsäure im Muskelinnern gemachten Annahmen. Nach ihm sollen die Aminogruppen in einem echten Neutralisationsvorgang mit der Milchsäure reagieren (vgl. *Asher-Spiros* Ergebnisse 17, 405 u. 406. 1919). Dies könnte sich aber erst auf der sauren Seite des isoelek-

aber eine völlige Interpretation derselben, auch in quantitativer Richtung, ermöglichen die bisherigen Versuche nicht. Denn es gilt, die Differenz zwischen der Kontraktionswärme 375 cal. und der thermochemischen plus Verdünnungswärme = 170—180 cal., also den Ursprung von 200 cal. nachzuweisen, aber wir haben hier nur 140 cal. gefunden. Dieser Unterschied übersteigt bei weitem die Fehlergrenze. An sich ist es nun ganz gut möglich, daß die Dissoziationswärme einzelner Muskeleiweißkörper noch etwas größer ist als die des ganzen Muskelplasmas oder des Serumeiweißes, die hier gemessen ist. Indes ist es doch unwahrscheinlich, daß diese in wässriger Lösung jemals mehr als 153 cal. pro 1 g Milchsäure beträgt. In diesem Fall wäre die Dissoziationswärme nämlich gleich der des Wassers und bei noch höherem Betrag würde sie diese übertreffen und damit die Neutralisationswärme der schwachen Proteinsäure auf Grund der mehrfach gebrauchten Formel negativ werden. Wahrscheinlicher ist es, daß die Entionisierungswärme des Eiweißes größer ausfällt, wenn es sich nicht in wässriger Lösung befindet, sondern in einer anderen Phase, oder vielleicht auch unter der Wirkung von Oberflächenkräften steht. Faktoren, die eine möglichst enge Vereinigung des Wasserstoffatoms mit dem Proteinsäurerest im entladenen Molekül herbeiführen, die also dahin streben, das Molekularvolumen zu verkleinern, ferner solche, die eine vollständigere Absättigung von Affinitätsresten gestatten, als sie in wässriger Lösung möglich ist, dürften in diesem Sinne wirksam sein. Dies muß weiterer experimenteller Prüfung vorbehalten bleiben. Das wichtigste Ergebnis dieses Kapitels ist jedoch, daß statt der bisher angenommenen Neutralisierungswärme der Milchsäure von etwa 20 cal. durch basische Salze, jedenfalls 140 cal. durch die Gegenwart von Eiweiß zur Verfügung stehen. Auch im einzelnen läßt sich noch nicht sagen, wie der Neutralisierungsvorgang im Muskelinnern vor sich geht. Als weitere Folgerung erscheint aber, daß die Milchsäure nicht an Eiweiß gebunden wird, sondern daß bei der Entladung des Proteins freies Alkalilactat entsteht. Es ist wahrscheinlich, daß dieses von vornherein in kleinen Mengen den Muskel verlassen und z. B. im lebenden Tier ins Blut übertreten kann, ohne daß deshalb die Kontraktionswärme sich verringert. Solange Alkali aus dem ionisierten Eiweiß abgespalten wird, muß diese Wärme auftreten, dagegen sich verkleinern, wenn anorganische basische Salze mit dem Eiweiß in Konkurrenz treten. Im intakten Muskel scheint dies unter normalen Umständen nur ganz unbedeutend vorzukommen, dagegen tritt dieser Fall in alkalischer trischen Punktes der Eiweißkörper abspielen, die bei der Ermüdung sicher nicht erreicht wird, da kaum der Neutralpunkt überschritten wird; ferner würde dieser Vorgang nach obigem fast ohne Wärmetönung verlaufen und schließlich müßte die Milchsäure dadurch indiffusibel werden, während sie ja leicht ins Blut übertreten kann.

Ringerlösung offenbar mehr und mehr ein, je mehr Milchsäure sich bereits gebildet und dem Muskeleiweiß Alkali entzogen hat und in zunehmendem Maße setzt sich dann die Milchsäure mit Phosphat und Carbonat um. Andererseits wird im zerschnittenen Muskel vielleicht der physikalisch-chemische Zustand des Eiweißes gleich verändert, indem es sich mit dem Phosphat der Lösung umsetzt, so daß es dann kein abspaltbares Alkali mehr besitzt. Schließlich kann man auch annehmen, daß das Ermüdungsmaximum, falls basische Salze nicht besonders zur Verfügung gestellt werden, durch den Alkalivorrat des Eiweißes der „Ermüdungsorte“ bedingt ist. Es muß uns hier genügen, die Verhältnisse in groben Umrissen anzudeuten.

Kapitel V.

Bemerkungen zu den chemischen Vorgängen bei der Kontraktion.

a) Keine Bildung anaerober Kohlensäure.

Da eine restlose Aufhellung über den Ursprung der 200 cal. Milchsäurereaktionswärme uns nicht gelungen ist, kann gefragt werden, ob der unaufgeklärte Rest von 60 cal. nicht doch auf eine etwaige Nebenreaktion zurückgeführt werden könnte, und da kämen aus Gründen, die bereits in der Einleitung erwähnt sind, vor allem solche in Betracht, die zur Kohlensäureabspaltung führen. Diese Frage interessiert uns auch wegen des im nächsten Abschnitt zu erörternden Gedankens, ob eine geringfügige Menge Milchsäure vielleicht auch anaerob verschwinden könnte. Als exotherme Reaktion wäre hier ehestens an eine Decarboxylierung zu denken. *Fletcher* hat in mehreren Arbeiten bereits nachgewiesen¹⁾, daß die früher auf anaerobe *Bildung* bezogene Kohlensäureabgabe eines Muskels in Stickstoff zwanglos dadurch erklärt werden kann, daß sie die Folge der zunehmenden Acidität ist, also lediglich eine Austreibung durch die entstandene Milchsäure. Doch vermisste ich in seinen Arbeiten den Nachweis, daß sie *notwendig* und *restlos* so erklärt werden muß. Hierfür muß der Gehalt präformierter Kohlensäure in identischen Muskeln vor und nach der Anaerobiose miteinander verglichen werden. Für die zerschnittene Muskulatur in Wasserstoff ist dies schon früher geschehen²⁾, für den intakten Sartorius in Stickstoff habe ich es jetzt nachgeholt. In einem 23stündigen und einem 27stündigen Anaerobioseversuch bei 17° war der Kohlensäuregehalt der symmetrischen Sartorien vor und nach dem Aufenthalt in Stickstoff vollkommen gleich. Die Übereinstimmung ist innerhalb eines Kubikmillimeters genau, während im gleichen Zeitraum bei gleicher Temperatur durch Atmung je 120—130 cmm CO₂ gebildet sein würden.

¹⁾ Journ. of physiol. **23**, 10. 1898; **28**, 354. 1902; **47**, 361. 1913; *Fletcher* und *Brown*, **48**, 177. 1914.

²⁾ Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **175**, 20. 1919.

b) Kein meßbares anaerobes Verschwinden von Milchsäure.

Aus verschiedenen Gründen mußte die Frage untersucht werden, ob nicht auch schon anaerob ein gewisser Teil der bei der Kontraktion gebildeten Milchsäure verschwinden kann. Sollte dies allerdings in *größerm* Umfange stattfinden können, so müßte wegen der genauen Übereinstimmung der Kohlenhydrat- und Milchsäurebilanz auch in diesem Fall die Milchsäure zu Zucker regeneriert sein. Und da dieser Vorgang endotherm und unfreiwillig verläuft, ein anderer unbekannter anoxydativer Vorgang die Arbeit dafür liefern. Daß dieser zweite Prozeß dann sogar einen Überschuß von Energie besitzen sollte, ist wenig wahrscheinlich. *Embsen* und Mitarbeiter glauben ein anaerobes Verschwinden von Milchsäure aus dem Muskelbrei von Kaninchen beobachtet zu haben¹⁾ und ferner haben sie neuerdings festgestellt, daß bei der Kontraktion anorganische Phosphorsäure auftritt, die sich schon anaerob wieder in organische zurückverwandelt. Dies letztere steht nun zwar in völliger Übereinstimmung mit meinen bisherigen Resultaten und es war eine schon wiederholt gezogene Folgerung von mir, daß die bei der Kontraktion aus dem Lactacidogen abgespaltene Phosphorsäure sich bereits anaerob mit neuem aus Glykogen gebildeten Zucker zur Hexosephosphorsäure resynthetisieren müßte. Wenn indes die Menge der bei der Kontraktion abgespaltenen Phosphorsäure analytisch faßbar sein sollte, war nur einer von folgenden 3 Fällen möglich: Entweder verschwindet die Phosphorsäure nicht im Erschlaffungsvorgang selbst, sondern unabhängig von ihm nach Ablauf der Kontraktion, was natürlich bei längerer tetanischer Reizung teilweise noch in das Stadium der Verkürzung fallen könnte; oder die Phosphorsäure und Milchsäure sind nicht äquivalent, wie es bei der Hexosephosphorsäure als Milchsäurevorstufe vorausgesetzt wird, oder drittens es verschwindet mit der Phosphorsäure gleichzeitig Milchsäure. Dies folgt nämlich daraus, daß, wie früher berechnet wurde²⁾, für die Erzeugung von 1000 g Spannung in 1 g Muskel, was etwa der maximalen tetanischen Leistung entspricht, nur 0,04 mg Milchsäure produziert werden. Damit sind 0,044 mg Phosphorsäure in dem Hexosephosphorsäureester äquivalent. Auf 100 g Muskel also 4,4 mg. Diese Menge beträgt nur 1% der von *Embsen* und seinen Mitarbeitern im Muskel bestimmten Phosphorsäure, etwa 3% der Lactacidogen-Phosphorsäure³⁾. Aus den folgenden Versuchen geht nun hervor, daß kein meßbares anaerobes Verschwinden von Milchsäure unmittelbar nach der Kontraktion zu konstatieren ist, und

¹⁾ Zeitschr. f. physiol. Chem. **113**, 45ff. 1921.

²⁾ Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **191**, 143. 1921.

³⁾ Siehe z. B. *Wechselmann*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **113**, 156ff. 1921.

es bleibt somit von obigen Möglichkeiten nur eine der beiden ersten übrig¹⁾).

Um festzustellen, ob auf der Höhe maximaler tetanischer Kontraktion mehr Milchsäure im Muskel vorhanden ist als unmittelbar danach, wurde so verfahren, daß die symmetrischen Gastrocnemien mit ihren Nerven präpariert wurden; dann einige Zeit auf 0° abgekühlt wurden, um den Kontraktionsablauf zu verlangsamen. Die Nerven wurden darauf parallel über Drähte gebrückt, die auf einer Korkplatte befestigt waren. Der eine Muskel ruhte ebenfalls auf dieser gekühlten Korkplatte, der andere hing in eine flache gekühlte Reibschale herab. Es wurden zunächst einige Probereize gegeben, um festzustellen, ob beide Muskeln gleichmäßig zuckten, und dann ein maximaler Tetanus. Während desselben wurde der in der Reibschale liegende Muskel mit Alkohol von —5° übergossen und momentan zerdrückt und gleichzeitig der Reizstrom unterbrochen. Nach kurzer Zeit wurde der zweite Muskel mit dem gleichen Alkohol von —5° zerrieben. Es fand sich nun in mehreren Versuchen, daß der auf der Höhe der Kontraktion zerriebene Muskel meist weniger Milchsäure enthielt als der andere. Und das ist leicht erklärlich, denn der Reizstrom wurde abgestellt, während der mit Alkohol übergossene Muskel zerquetscht wurde, was immerhin etwa 1—2 Sekunden nach dem Aufgießen des Alkohols in Anspruch nahm. Hier wurde also die Milchsäureproduktion unterbrochen, während der Kontrollmuskel noch in Kontraktion war. Wenn nun hierdurch eine gewisse Unsicherheit des Resultats bedingt ist, so ist doch andererseits, wenn der Versuchsmuskel sehr rasch nach Beginn des Tetanus mit Alkohol übergossen wurde, sein Milchsäuregehalt gegenüber dem Ruheminimum so außerordentlich wenig erhöht, daß schon dadurch allein ein Verschwinden von mehr als 0,10 mg Milchsäure pro Gramm Muskel ausgeschlossen werden kann.

Tabelle XIII.

Milchsäuregehalt des Muskels während und nach der Kontraktion.

Nr.	Datum	Muskelgewicht	Während der Kontraktion zerrieben		Nach der Kontraktion zerrieben	
			Milchsäure mg	Milchsäure %	Milchsäure mg	Milchsäure %
1	12. I.	1,0	0,135	0,0135	0,28	0,028
2	22. IX.	1,0	0,22	0,022	—	—
3	24. IX.	1,1	0,495	0,045	0,875	0,079
4	9. II.	1,0	0,29	0,029	0,16	0,016
5	15. II.	1,25	0,31	0,024	0,40	0,032

¹⁾ Aus der während des Druckes dieser Arbeit erschienenen ausführlichen Publikation von *Embsen* und *Lawaczek*, *Biochem. Z.* **127**, 181, ergibt sich noch eine weitere Möglichkeit, daß die freigemachte Phosphorsäure — bis zu 25% der gesamten anorganischen — nicht durch den Kontraktionsvorgang in vivo selbst

c) *Über die mutmaßliche Stellung der Eiweißpentionisierung im Kontraktionsvorgang.*

Falls unsere Annahme richtig ist, daß neben der chemischen Zersetzungswärme des Glykogens in Milchsäure und der Verdünnungswärme dieser letzteren als zweiter hauptsächlicher Wärmefaktor eine umgekehrte Dissoziationswärme von Eiweiß tritt, wenn auch vermutlich in nichtwässriger Phase, muß die Stellung dieser Wärmen im Kontraktionsprozeß sowohl in thermodynamischer wie in zeitlicher Beziehung erörtert werden. Zunächst interessiert die Frage, ob im Prinzip die freie Energie dieser Vorgänge ausreichen würde, um die Muskelarbeit leisten zu können. In der vorigen Arbeit wurde die Annahme gemacht, daß, wenn die chemische Wärme nur 100 cal. von 400 cal. ausmachen sollte, sie vielleicht überhaupt im Kontraktionsakt nicht ausgenutzt würde, da die restierenden 75% ihn bestreiten könnten. Diese Annahme muß jetzt aufgegeben werden, denn die gefundenen 160 cal. von 375 stellen einen zu erheblichen Anteil der Gesamtwärme dar. Nun verläuft der Kontraktionsvorgang natürlich nicht so einfach, daß er sich energetisch lediglich aus den beiden betrachteten Prozessen zusammensetzt. Vielmehr ist schon früher darauf hingewiesen, daß sich an die Entstehung der Milchsäure mindestens noch 3 Vorgänge anschließen müssen. Der eine bestände in der Einwirkung der Milchsäure auf die Verkürzungsflächen, wodurch deren elastische Ruhelänge sich plötzlich ändert, und er muß für sich allein bereits soviel Arbeitsfähigkeit besitzen wie als mechanische Leistung in Erscheinung tritt. Um die Erschlaffung zu ermöglichen, muß die Milchsäure von hier entfernt werden; dies ist aber nur durch Aufwand von Arbeit möglich, welche durch einen dritten Prozeß, eben die „Neutralisierung“ im Muskelplasma geliefert wird¹⁾. Indes kommt es hier auf diese Zwischenglieder nicht an, da ja für die Änderung der freien Energie wie für die der Gesamtenergie der Satz gilt, daß sie eindeutig durch den Anfangs- und Endzustand des Systems bestimmt sind.

Für die Spaltungswärme Glucose—Milchsäure kann man auf Grund des *Nernstschen* Wärmetheorems annehmen, daß beim Übergang von festem Zucker in feste Milchsäure die maximale Arbeit der Wärmetönung gleich ist, weil keine Gasmoleküle auftreten oder verschwinden. Dagegen fehlt für den Vorgang in Lösung die Kenntnis der Lösungs-

abgespalten worden ist, sondern durch die Abtötung des maximal kontrahierten Muskels mittels flüssiger Luft. Der direkt, ungereizt, in flüssige Luft getauchte Muskel spaltet nämlich am meisten Phosphorsäure ab und kontrahiert sich hierbei am stärksten. Der Hexosephosphorsäureester würde sich danach auf der Höhe der Kontraktion in einer erhöhten Disposition zum Zerfall befinden.

¹⁾ Siehe hierzu auch *v. Kries*, *Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol.* **190**, 66. 1921, der sich dieser allgemeinen Vorstellung anschließt.

affinitäten; falls sie gering sind oder sich wenig unterscheiden, würde die Gleichheit von Wärmetönung und maximaler Arbeit annähernd bestehen bleiben.

Andererseits berechnet sich die maximale Arbeit des Dissoziationsvorganges bzw. der Entionisierung (für binäre Elektrolyte) nach der bekannten Formel $A = -RT \cdot \ln K + RT \ln \frac{C_A \cdot C_K}{C_M}$, K = Dissozia-

tionskonstante, C_A Konzentration des Anion, C_K Konzentration des Kation, C_M Konzentration des ungespaltenen Moleküls. Bei passender Wahl der Konzentrationen und kleiner Dissoziationskonstante können die Werte für A die Wärmetönung mehr oder weniger stark übersteigen. Für die Neutralisation von $\frac{n}{10}$ -HCl und $\frac{n}{10}$ -NaOH, d. h. die Umkehr der Dissoziation des Wassers, findet man z. B., entsprechend der elektromotorischen Kraft von 0,695 Volt, (bei 20°) eine Arbeit von 16 750 cal. bei 13 700 cal. Wärmetönung pro Mol. Die Arbeitsfähigkeit der beiden Prozesse erscheint also ausreichend. Die Entionisierung des Eiweißes muß den Abschluß des Kontraktionsvorganges bilden, da sie ja den Endzustand des Systems veranlaßt, den wir bei unserer thermischen und chemischen Analyse am Schluß der anaeroben Ermüdung vorgefunden haben. Es liegt also nahe, den Prozeß dem Erschlaffungsvorgang zuzuordnen. Dieser verhält sich nun, wie vor allem die Messungen von *Hartree* und *Hill* zeigen, ganz ähnlich wie eine chemische Reaktion¹⁾. Sowohl seine Dauer selbst zeigt einen ausgesprochenen chemischen Temperaturkoeffizienten, als auch der offenbar durch die Geschwindigkeit des Erschlaffungsvorgangs regulierte Energieumsatz bei anhaltender tetanischer Kontraktion. Es ist nun zu sagen, daß zwar ein einfacher Diffusionsvorgang einen solchen Temperaturkoeffizienten nicht zeigen würde, daß man aber beim Eindringen von Substanzen in Zellen unter Umständen eine ähnliche Temperaturbeeinflussung findet wie es z. B. *Masing* für Blutzellen²⁾ und *Delf* für Pflanzenzellen³⁾ nachgewiesen haben. Indes kann man sich fragen, ob die hier in Rede stehende Reaktion nicht vielleicht diesen chemischen Temperaturkoeffizienten veranlassen könnte. Nach den Versuchen von *Benedicks*⁴⁾ sowie von *Thiel* und *Strohhecker*⁵⁾ verlaufen Ionenreaktionen mit unmeßbar großen Geschwindigkeiten. Andererseits lehren aber die Untersuchungen der letztgenannten Autoren, daß mit diesen Ionenreaktionen weitere verknüpft sein können, durch die die Geschwindig-

1) Journ. of physiol. **55**, 133. 1921; **55**, 389, besonders 393 ff.

2) Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **156**, 401.

3) Ann. of botany **30**, 283. 1916.

4) Zeitschr. f. phys. Chem. **70**, 12. 1912.

5) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. **47**, 945. 1914.

keit der Ionenreaktionen beherrscht, und ihnen ein von der Temperatur abhängiger langsamer Gang aufgezwungen werden kann. Dies ist z. B. bei der Neutralisation von Kohlensäure mit Natronlauge der Fall. Momentan verläuft nur die Reaktion von $[\text{H}_2\text{CO}_3]$ bzw. HCO_3' mit Alkali. Sobald aber das präformierte Hydrat und dessen Ionen verbraucht sind, schließt sich die langsame Reaktion $\text{CO}_2 + \text{OH}' = \text{HCO}_3'$ an und die neu entstandenen Ionen reagieren neuerdings mit der Natronlauge bis das ganze gelöste CO_2 verbraucht ist. Stellen wir uns den Vorgang in umgekehrter Richtung vor, so muß die Zersetzung von NaHCO_3 durch Säure ebenfalls mit meßbarer Geschwindigkeit verlaufen (wobei wir von der katalytischen Wirkung des H' -Ions absehen), indem erst allmählich aus HCO_3' CO_2 und OH' entsteht und dadurch die Vereinigung von OH' mit dem H' -Ion der Säure fortschreiten kann. Es wäre nun ganz gut denkbar, daß die Isomerisation der freien Proteinsäure zum innern Ammoniumsalz diese langsame Reaktion darstellt; doch habe ich mich bisher vergeblich bemüht, beim schnellen Zusammengießen von Glykokoll-Lösung mit passend konzentrierter Lauge oder Säure bei 0° einen Zeitverlauf der Reaktion — mittels zeitlicher Änderung von Indicatorfarben — zu entdecken.

Von besonderem Interesse erscheint die Feststellung von *Hartree* und *Hill*, daß der Temperaturkoeffizient der Anspannungszeit pro 10° 2,5, der der Erschlaffungszeit aber 3,6 ist, wodurch deutlich 2 verschiedene Vorgänge getrennt werden. Ich habe auf Grund der Überlegung, daß im zerschnittenen Muskel sich lediglich der chemische Vorgang der Milchsäurebildung abspielt und dann nur noch die Ionenreaktion mit Phosphat, den Temperaturkoeffizienten dabei bestimmt. Leider waren die Ergebnisse wegen des allmählichen Nachlassens der Geschwindigkeit der Milchsäureproduktion in der zerschnittenen Muskulatur nicht sehr genau, immerhin ergab sich zwischen 0° und 22° ein Temperaturkoeffizient zwischen 2 und 2,5, wenn man für die Berechnung Messungen von annähernd gleichem Umsatz, der in verschiedenen Zeiten erreicht wird (und nicht den Umsatz gleicher Zeiten) zugrunde legt. Dies ist in der Tab. XIV für 3 Versuche geschehen.

Man sieht hier, daß der Temperaturkoeffizient dem der Spannungszunahme ähnlich und erheblich kleiner als der der Erschlaffung ist. Damit wurde der Temperaturkoeffizient der Ruhemilchsäurebildung des intakten Muskels verglichen, da sich ja hier die Reaktion der Milchsäure mit dem Muskeleiweiß anschließt. Auch diese Versuche sollen unter günstigeren Umständen wiederholt werden. Es standen mir nur sehr kleine Frösche (Temporarien) zur Verfügung, von denen je 1—2 für jeden Temperaturversuch verwandt werden mußten. Infolge individueller Schwankungen der Milchsäurebildung und relativ kleiner Ausschläge sind auch diese Versuche nicht sehr genau. Immerhin ergab

Tabelle XIV.

Temperaturkoeffizient der Milchsäurebildung in der zerschnittenen Muskulatur.

Nr.	Muskel g	Zerschneidungs- grad	Vorher		Zeit	Temp.	Nachher		In 1 Std. Milchs. gebildet %	K pro 10°
			Milchs. mg	Milchs. %			Milchs. mg	Milchs. %		
1. 3. XII.	2,8	sehr fein	1,58	0,0565	1 ^h 50'	0°	6,32	0,226	0,092	2,25
	2,8	„			50'	12,8°	7,47	0,267	0,267	
	2,8	„			1 ^h 50'	12,8°	10,55	0,377	0,175	2,4
	2,8	„			50'	22,1°	10,65	0,383	0,179	
2. 17. II.	2,5	grob zerschnitt.	1,82	0,073	2 ^h	0,2°	4,88	0,195	0,061	2,1
	2,5	„			1 ^h	12,3°	5,58	0,223	0,150	
	2,5	„			2 ^h	22,1°	8,4	0,336	0,1315	2,03
	2,5	„			1 ^h	22,1°	8,4	0,336	0,263	
3. 10. II.	2,4	grob zerschnitt.	0,7 ¹⁾	0,03	2 ^h 20'	0,2°	3,94	0,164	0,0575	2,7
	2,4	„			1 ^h	10,3°	4,54	0,189	0,159	
	2,4	„			2 ^h 20'	10,3°	7,2	0,300	0,116	2,35
	2,4	„			1 ^h	22°	8,05	0,335	0,305	

sich das zweifelsfreie Resultat, daß der Temperaturkoeffizient in diesem Fall sehr erheblich größer ist, und zwar zwischen 3 und 4 gelegen ist. Diese Versuche sind auf Tab. XV angeführt. Es wurden nichtenthäutete Froschenkel in blausäurehaltiger Ringerlösung im Thermostaten suspendiert und nach Ablauf der Versuchszeit auf Milchsäure verarbeitet.

Tabelle XV.

Temperaturkoeffizient der Milchsäurebildung intakter Muskeln.

Nr.	Zahl der Frösche	Gewicht der Muskulatur	Versuchs- zeit	Temp. Grad	Milchsäure mg	Milchsäure %	Milchsäure gebildet %	K pro 10°
1. 10. II.	1	2,5	0		0,43	0,017		
	2	5,9	7 ^h 50'	0,2	1,64	0,028	0,011	
	2	5,45	7 ^h 50'	10,4	3,53	0,065	0,048	4,3
	2	4,9	7 ^h 50'	22,0	10,13	0,207	0,190	3,25
2. 16. II.	1	5,3	0		0,513	0,010		
	2	14,75	19 ^h 50'	0,8	7,1	0,048	0,038	
	2	14,1	6 ^h 20'	10,3	8,07	0,057	0,047	4,1
	2	10,95	6 ^h 20'	22,1	20,15	0,165	0,155	3,05

Da der Temperaturkoeffizient in der zerschnittenen Muskulatur auf den Vorgang der chemischen Milchsäurebildung bezogen werden muß, weil sich ja an diese nur noch die Ionenreaktion mit Phosphat anschließt und dieser vollständig übereinstimmt mit dem der Spannungszunahme des Muskels, so muß offenbar die Milchsäurebildung der Spannungs-

¹⁾ Nicht genau.

zunahme zuzuordnen sein. Da nun andererseits der Temperaturkoeffizient der Milchsäurebildung im intakten Muskel offenbar dem der Erschlaffung gleich ist, so liegt es nahe für beides den Umsatz der Milchsäure mit dem Muskeleiweiß in Anspruch zu nehmen.

d) *Betrachtungen zum gesamten Kontraktionszyklus.*

Wenn in der oxydativen Erholung die Milchsäure schwindet, muß unter Wiederzerlegung des Alkalilactats eine neue Ionisierung von Eiweiß einsetzen und dieser Vorgang beansprucht dann neben dem Neuaufbau von Glykogen einen Teil der Energie des Oxydationsprozesses. Stets wurde unter günstigen Umständen gefunden, daß nach mehr oder weniger fortgeschrittener Ermüdung bei der oxydativen Erholung 4 Moleküle Milchsäure verschwinden, wovon eines verbrennt. Dies Verhältnis kann sich beim Zerschneiden, wo ja auch der Sauerstoff Milchsäure zum Verschwinden bringt, bis zu 5 : 1 steigern¹⁾, was ich inzwischen mehrfach festgestellt habe. Indes kann der größere Nutzeffekt dieses Erholungsvorganges eventuell darauf bezogen werden, daß hier der Energieaufwand für die Eiweißdissoziation in Wegfall kommt und zum Teil auch darauf, daß die Milchsäure nicht mehr vollständig zu Glykogen zurückverwandelt wird, sondern zum Teil auf einer unbekannten Zwischenstufe stehenzubleiben scheint. Jedenfalls habe ich bisher keine sicheren Anhaltspunkte dafür gefunden, daß im intakten Muskel das Verhältnis der verschwindenden zur verbrannten Milchsäure größer als 4 : 1 sein kann. Wenn auch diese Frage noch nicht erledigt ist, müssen also hierbei für 1 g in Reaktion tretenden Zuckers

bzw. 0,9 g Glykogen $\frac{3772}{4} = 943$ cal. auftreten. Da wir in der Ermüdung 375 fanden, müssen wir in der oxydativen Erholung 943 — 375 = 568 haben, d. h. genau 40% der Wärme treten in der Ermüdungsphase, 60% in der Erholungsperiode auf. Während *Hill* in früheren Versuchen mit einzelnen Kontraktionen schätzungsweise ein Verhältnis beider Wärmen von 1 : 1 fand, haben ganz neuerdings *Hartree* und *Hill* bei photographischer Registrierung und genauer zeitlicher Analyse des Galvanometerausfalls festgestellt, daß im Durchschnitt einer größeren Zahl von Versuchen das Verhältnis genau 1 : 1,5 (meist zwischen 1,4 und 1,6) ist²⁾. Dies erscheint zunächst in vorzüglicher Übereinstimmung mit den Ergebnissen meiner Versuche. Ein Umstand beeinträchtigt diese Rechnung indes erheblich und warnt vorläufig vor einer gar zu bestimmten Vergleichung von Zahlen, die als Mittelwerte aus ziemlich weit voneinanderliegenden Daten gewonnen sind. Die

¹⁾ Vgl. Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **188**, 135.

²⁾ Journ. of physiol. **56** (Im Druck). 1922; siehe auch A. V. *Hill*, Physiological reviews. 1922.

Autoren fanden nämlich auch in der Anaerobiose eine nicht unbeträchtliche „Erholungswärme“, die gegen 40—50% der initialen Wärme ausmacht. Der Ursprung dieser ist ziemlich unklar. Auch wenn die anaerobe Rückbildung der Hexosephosphorsäure aus abgespaltener Phosphorsäure und neugespaltenem Glykogen nach obigem sich wohl erst nach Ablauf der Kontraktion vollziehen dürfte und als freiwilliger Vorgang exotherm verlaufen wird, kann ihre Wärme doch unmöglich höher sein als die Spaltungswärme Glykogen → Zucker. Das sind 30 cal. pro 1 g, was noch nicht 10% der anaeroben Kontraktionswärme ausmacht. Auch ist vorläufig noch nicht klargestellt, ob die „anaerobe Restitutionswärme“ auch in Sauerstoff als Teil der hierbei auftretenden oxydativen Erholungswärme in Erscheinung tritt. Immerhin bleibt die Möglichkeit, daß nach ganz kurzer Reizung die Milchsäure mit noch weniger Sauerstoff schwinden kann, als ich es bei weitgehender Ermüdung feststellte. Hier kann erst weitere Forschung volle Klarheit schaffen.

Zusammenfassung.

In der Arbeit wird der Ursprung von etwa 400 cal. Wärme pro Bildung von 1 g Milchsäure aus Glykogen („kalorischer Quotient der Milchsäure“) bei der anaeroben Kontraktion des Muskels untersucht.

Kapitel I enthält die Resultate einer Neubestimmung der Verbrennungswärme der Milchsäure auf dem Weg über wasserfreies Zinklactat. Es ergibt sich pro 1 Mol 325 700 cal. pro 1 g 3615 cal. (berechnet für 70 proz. Säure), für die Verdünnungswärme 14 cal. Die Differenz der Verbrennungswärme des Glykogens (nach *Stohmann*) und der Milchsäure (konzentriert) ist mithin 157 cal.

In Kapitel II wird zunächst der kalorische Quotient der Milchsäure bei der elektrischen Ermüdung bei 14° und 22° teilweise neu bestimmt und beträgt bei Benutzung von 21 zuverlässigeren Versuchen, darunter 8 neuen, im Mittel 370 cal., ohne daß systematische Schwankungen erkennbar sind. Wird dagegen die Milchsäure- und Wärmebildung in der zerschnittenen Muskulatur in Phosphatlösung bestimmt, so findet man einen kalorischen Quotienten von fast genau 200 cal. (8 Versuche). Gleichzeitig läßt sich feststellen, daß die Milchsäure sich gleichmäßig zwischen Lösung und Muskelmasse verteilt, so daß die letztere nur die Rolle einer Salzlösung spielt. Die Milchsäure ist dabei in diffusibler Form in der Phosphatlösung vorhanden. Die aufgetretenen 200 cal. stimmen innerhalb der Fehlergenauigkeit überein mit der thermochemisch berechneten Wärme, die sich aus der Spaltungswärme des Glykogens 157 cal., Verdünnungswärme der Milchsäure 14 cal., Umsatzwärme mit Phosphat 19 cal. zusammensetzt: Summe 190 cal. Daß die Verringerung der Wärmebildung im zerschnittenen Muskel durch

nichts anderes bedingt ist wie durch den Übergang der Milchsäure in die Lösung, wird durch den kalorischen Quotienten der Ruheanaerobiose bewiesen. Während dieser bei nichtabgehäuteten Fröschen in kurzen Zeiträumen genau gleich ist dem der tetanischen Reizung (3 Versuche: Durchschnitt 378 cal.) ist er bei abgehäuteten Fröschen in alkalischer Ringerlösung und langen Zeiträumen 275 cal. (3 neue und 4 ältere Versuche). Daß hier die Verringerung um 100 cal. durch den Übergang von gut 50% der Milchsäure in die Lösung verursacht wird, geht auch daraus hervor, daß der berechnete kalorische Quotient der Anfangszeit 370 cal. ist wie bei nichtenthäuteten Fröschen, der der Schlußzeit aber gegen 225 cal., wenig größer wie in der zerschnittenen Muskulatur.

Kapitel III. Die Reaktionswärme der Milchsäure mit Substanzen des intakten Muskelinnern ist ganz oder zum größten Teil auf das H-Ion zurückzuführen. Läßt man eine Säure, Valeriansäure, in den Muskel eindringen, so entsteht Wärme ohne gleichzeitige Produktion von Milchsäure, und zwar bei den hier benutzten Versuchsmengen gegen 0,3 cal. pro 1 g Muskel, annähernd halb so viel wie bei der tetanischen Ermüdung (die fragliche Reaktionswärme muß aber etwa die Hälfte des kalorischen Quotienten ausmachen). Beim Eindringen von Essigester in den Muskel wird bei etwa gleichen Konzentrationen nur 0,1 cal. pro 1 g Muskel ohne Milchsäureäquivalent gebildet. Diese Wärme ist möglicherweise auch auf abgespaltene Säure zu beziehen.

Kapitel IV. Die gesuchte Reaktionswärme der Milchsäure im Muskel, 190—200 cal., kann zum wesentlichen Teil erklärt werden als bedingt durch die Dissoziationswärme des Eiweißes. Während nämlich bei der Neutralisierung von 1 g Milchsäure durch Phosphat oder Carbonat etwa 20 cal. entstehen, steigt die Wärme beträchtlich schon bei beliebigen eiweißhaltigen Flüssigkeiten wie Blutserum, Eiereiweiß, Hefeextrakt, Caseinlösung u. dgl. Das Studium der Reaktionswärme gepufferter Aminosäurelösungen zeigt nun, daß bei dem Umsatz dieser mit Milchsäure oder Salzsäure Wärme auftritt, die als umgekehrte Dissoziationswärme der Aminosäuren zu erklären ist, und zwar gegen 130 cal. pro 1 g Milchsäure (molare Dissoziationswärme —11 300 cal.). Im Prinzip die gleiche Wärme, die absolut noch etwas größer ist, erhält man mit gepufferten konzentrierten Lösungen von Serumglobulin oder Serumalbumin sowie Muskeleiweiß, frei von basischen Salzen, und zwar 137 bzw. 140 cal. pro 1 g Milchsäure, woraus sich die Dissoziationswärme der Proteine für die Säuredissoziation von —12 350 und —12 600 cal. berechnet, die größte bisher bekannte Dissoziationswärme. Es wird die Hypothese aufgestellt, daß die Dissoziationswärme des Eiweiß im Muskel um den hier noch fehlenden Betrag von etwa 60 cal. deshalb größer ist, weil die Entionisierung des Eiweiß in einer nichtwässrigen Phase oder auch an Strukturoberflächen zustande kommt.

Kapitel V. Es wurde keine Nebenreaktion gefunden, durch die der fehlende Betrag von 60 cal. erklärt werden könnte. Anaerobe Kohlensäure wird nicht gebildet. Milchsäure verschwindet nicht in meßbarer Menge anaerob nach der Kontraktion. Daß dies unmittelbar in einer exothermen Reaktion geschehen sollte, widerspricht auch der früher gefundenen Äquivalenz der Kohlenhydrat- und Milchsäurebilanz. Daß aber ein anaerober Vorgang genügend Arbeitsfähigkeit besitzen sollte, um in gekoppelter Reaktion Milchsäure in Kohlenhydrat zurückzuverwandeln und dabei noch einen Überschuß positiver Wärme liefern, ist wenig wahrscheinlich. — Der Temperaturkoeffizient der Milchsäurebildung pro 10° in der zerschnittenen Muskulatur liegt zwischen 2 und 3, in der intakten beträgt er gegen 4. Ersteres entspricht etwa dem von *Hill* und *Hartree* gefundenen Temperaturkoeffizienten der isometrischen Spannungszunahme des Muskels, während der der Erschlaffung 3,6 wie der hier im intakten Muskel bestimmte ist. Da nun die vermutlich der Erschlaffung zugrunde liegende Neutralisierung der Milchsäure mit Muskeleiweiß in der zerschnittenen Muskulatur in Wegfall kommt, spricht die Übereinstimmung der genannten Temperaturkoeffizienten dafür, daß die Entstehung der Milchsäure der zunehmenden und nicht der abnehmenden Spannung zuzuordnen ist.

Frl. *Blonda Meyer* danke ich für ihre Hilfeleistung bei Ausführung der Arbeit.