

Über eine Methode der quantitativen Indolbestimmung im Kote.

Von

W. von Moraczewski.

(Aus dem physiolog. Institut der Universität in Lemberg, Vorstand Prof. Dr. A. Beck.)

(Der Redaktion zugegangen am 22. Januar 1908.)

Mit der Frage des Zusammenhanges des Harnindicans und des Kotindols beschäftigt, war ich bemüht, eine exakte Methode der Indolbestimmung im Kote zu finden, welche auch für klinische Beobachtungsreihen verwendbar wäre.

Die von Schmidt und Baumstark anempfohlene Dimethylamidobenzaldehydreaktion betrifft bekanntlich das Urobilinogen der Faeces und gibt zwar mit alkoholischer Indollösung eine Reaktion, aber diese steht der alten Nitroindolreaktion an Empfindlichkeit und Schärfe nach.

Die von Nencki vorgeschriebene Destillation mit der darauffolgenden Extraktion und Reindarstellung des Indols bedarf einer viel größeren Indolmenge, als man sie im Kote findet. Es war nun meine Aufgabe, aus diesen Methoden eine Kombination zu schaffen, welche den Ansprüchen der Genauigkeit und der Bequemlichkeit zugleich entspräche.

Bevor ich zu der Beschreibung der eigentlichen Methode übergehe, will ich die einzelnen Stadien der Bestimmung kritisch betrachten und diejenigen Methoden besprechen, welche hier in Frage kommen könnten.

Es ist vor allem notwendig, das Indol aus den Faeces durch Destillation auszutreiben. Dieses geschieht durch Kochen einer Kotprobe mit einer entsprechenden Menge Wasser. Das Kochen in saurer Lösung geht zwar viel ruhiger vor sich, führt aber zum Übergehen von sauren Destillationsprodukten (Phenole, organische Säuren, etc.) in das Destillat. Zudem ist das

Indol als schwache Base aus einer sauren Lösung weniger vollständig auszutreiben.

Das Kochen in alkalischer Lösung hat als Nachteil das lästige Schäumen der Flüssigkeit und gibt dem Destillat einen starken Gehalt an Ammoniak und Schwefelammonium.

Man könnte auch die Faeces einer zweifachen Destillation unterwerfen, indem man das aus saurer Lösung gewonnene Destillat nochmals aus alkalischer Lösung destilliert. Ich habe mich jedoch für die einfache Destillation aus neutraler Lösung oder ganz schwach alkalischer Lösung (die Faeces reagieren bekanntlich meistens alkalisch) entschlossen, nachdem ich mich durch Vorversuche überzeugt hatte, daß die erneute Destillation aus saurer Lösung zu wesentlichen Verlusten führt.

Um das Indol aus einer neutralen Lösung vollständig auszutreiben, genügt das Abdestillieren von $\frac{3}{4}$ der Flüssigkeit. Destilliert man von 700 ccm einer schwachen Indollösung 500 ccm ab, so kann man im Destillationsrückstand keine Reaktion mit Natriumnitrit und Schwefelsäure erzeugen. Auch die zuletzt übergehenden Portionen sind so gut wie indolfrei, allerdings muß die dabei verwendete Kotmenge nicht zu groß sein — so z. B. bei 20% Trockensubstanz nicht 30–40 g übersteigen. Normaler Kot hat ungefähr 20–25% Trockenrückstand — flüssiger Kot hat 5% und darunter und, dementsprechend darf die zur Analyse verwendete Menge größer sein bei flüssigen oder halbflüssigen Faeces.

Das Destillieren geht in neutraler Lösung ziemlich ruhig vor, wenn man gewisse Bedingungen beobachtet. Zuerst muß die Kotmenge nicht zu groß sein; zweitens muß der Kolben mindestens 1500 ccm fassen; drittens muß beim Beginne des Kochens der Kolbeninhalt peinlich überwacht werden und die Flamme möglichst klein gemacht. Wesentlich erleichtert wird das Destillieren bei Anwendung des Deslegmators von Huggers-hof-Leipzig für stark schäumende Flüssigkeiten. Hat man das anfängliche Schäumen glücklich überstanden, so ist es ein leichtes, die Destillation zu Ende zu führen. Sie dauert 2–3 Stunden.

Das Destillieren kann auf einem Destillationsapparate von

Kjeldahl für Stickstoffbestimmung ausgeführt werden, wobei zwei Portionen zugleich destilliert werden. Die Kühlung muß eine gute sein.

Hat man auf diese Weise das Indol in die Vorlage übergeführt, so kann man das Destillat je nachdem man es auf reines Indol verarbeiten will, oder zur Farbenreaktion benutzen, verschieden vorgehen.

Will man es auf Indol verarbeiten, so ist nach einer eventuellen nochmaligen Destillation aus alkalischer Lösung — wenn die erste aus einer sauren Lösung geschehen war — das Destillat durch Schütteln mit festem Bleicarbonat von den Schwefelprodukten, welche es trotz allem Destillieren begleiten, zu befreien. Nach dem Filtrieren wird das Destillat in einem Extraktionsapparat für Flüssigkeiten mit Äther während 24 Stunden ausgezogen. Der Ätherauszug wird bei kühler Temperatur in hochwandigen Gläsern verdunstet, über Schwefelsäure getrocknet und gewogen. Man kann den Rückstand zur quantitativen Reaktion benutzen, indem man ihn in Alkohol löst, mit 1 ccm einer 5%igen Dimethylamidobenzaldehydlösung versetzt, mit nicht ganz 1 ccm konzentrierter Salzsäure ansäuert und durch Alkoholzusatz auf ein bestimmtes Volumen bringt. Die rotgefärbte Lösung gibt einen deutlichen Absorptionsstreifen in Gelb und eignet sich gut zur spektrophotometrischen Bestimmung. Hat man mittels einer bekannten Indollösung ein Diagramm hergestellt, so sind die aus dem Destillat gewonnenen Zahlen direkt zu interpolieren. Jeder Schraubenstellung bei dem Spektrophotometer von Vierordt, oder jeder Differenz beim Spektrophotometer von Glan entspricht eine bestimmte Indolmenge auf 1 ccm Flüssigkeit und daraus ist die Menge des Indols im Destillat ohne weiteres zu ersehen.

Dieses wäre im großen und ganzen die eine Methode der quantitativen Indolbestimmung, welcher aber die weiter unten anzugebende vorzuziehen ist. Der eben beschriebenen Methode haften nämlich viele Fehler an. So führt das Ausschütteln mit Bleicarbonat und das Extrahieren mit Äther, besonders aber das Abdampfen zu Verlusten. Das mit vieler Mühe ge-

wonnene Indol ist lange nicht so rein, wie man erwarten sollte, und die Reaktion mit dem Aldehyd unsicher. Bei der großen Reaktionsfähigkeit des Aldehyds können unbedeutende Verunreinigungen zu wesentlichen Differenzen führen und den Farbenton beeinflussen.

Aus diesen Gründen habe ich mich für die folgende Bestimmungsweise entschieden: Von den 500 ccm Destillat wird eine Durchschnittsprobe von 150 ccm genommen, mit 10 Tropfen konzentrierter Schwefelsäure angesäuert und mit 1 g Kieselgur kräftig durchgeschüttelt. Kieselgur vermag in saurer Lösung die milchige Trübung des Destillates zurückzuhalten, ohne zu großen Indolverlusten zu bringen. Eine geringe Menge Indol wird wohl dem Kieselgur anhaften, bleibt aber bei gleichmäßigem Arbeiten wohl konstant. Von der genommenen Probe werden 100 ccm klar filtriert; da bereits Säure zugegen ist, werden nun 5 bis 10 Tropfen einer 2‰igen Natriumnitritlösung zugesetzt und das Maximum der Reaktion abgewartet.

Nach etwa 2 Stunden hat die Rosafärbung des Nitroindols ihr Maximum erreicht und die gefärbte Lösung ist nun mit einer bekannten Indollösung in einem Wolff'schen Kolorimeter¹⁾ zu vergleichen.

Von einer 1‰igen Indollösung (Kahlbaum, Berlin) werden 1 ccm in 500 ccm Wasser gelöst, davon 5 ccm auf 100 ccm verdünnt, mit 10 Tropfen konzentrierter Schwefelsäure und 5 Tropfen 2‰iger Natriumnitritlösung versetzt. Diese Lösung, welche 0,000002 g Indol in 1 ccm enthält, wird als Stammlösung benutzt. Mit der Stammlösung füllt man den einen Schenkel des Kolorimeters, in dem anderen wird das zu prüfende Destillat gebracht und entweder von der Stammlösung oder von dem Destillat so lange abgegossen, bis die beiden Schichten die gleiche Färbung erzeugen. Ratsam ist es, die Stammlösung auf 100 oder 50 ccm zu stellen und die zu prüfende Lösung auf eine Höhe zu bringen, welche der Färbung der Stammlösung entspricht.

¹⁾ Kolorimetrische und quantitative Spektralanalyse von Gerhard Krüss und Hugo Krüss, Leipzig und Hamburg 1891, S. 17.

Die Berechnung ist sehr einfach: Je geringer die Höhe der Schicht, welche mit der Stammlösung übereinstimmt, um so stärker der Indolgehalt. Wir haben z. B. 40 g Kot mit 700 Wasser versetzt und davon 500 abdestilliert. Von dem gut gemischten Destillat wurde in 100 ccm (damit der Zusatz von Säure und Natriumnitrit stets gleichmäßig bleibt) die Färbung erzeugt. Die gefärbte Lösung gibt nun in einer Schicht von 40 ccm Höhe die gleiche Nuance wie 100 ccm der Stammlösung. Somit verhält sich die Indolmenge der Probe zu der Stammlösung wie 100:40 oder es enthält die Probe 0,000005 g Indol in 1 ccm Wasser, wenn die Stammlösung 0,000002 g enthielt. Das ganze Destillat hatte somit 500mal mehr oder 0,0025 g Indol. Wenn nun die Kotmenge 200 g betrug, so ist die Menge des Indols, welche in 24 Stunden ausgeschieden wurde, 0,0125 g.

Die Bestimmung kann leicht in wenigen Stunden ausgeführt werden und bedarf keiner großen Kunst. Man achte nur darauf, daß die Stammlösung frisch bereitet wird und zwar am besten gleichzeitig mit den beiden Destillationsproben oder daß das Vergleichen nach längerem Stehen geschehe, wo der Einfluß der Zeitunterschiede verschwindet. Die Nitrofärbung des Destillates ist zuweilen gelblich nuanciert, was den Vergleich mit der Stammlösung erschwert. Es ist dann gut, die letztere durch sehr vorsichtigen Zusatz von Tropäolin oder Bichromatlösung auf die gleiche Farbe zu bringen. Bei konzentrierter Indollösung kommt es zum Abscheiden der Nitroverbindung, wobei die darüberstehende Flüssigkeit an Färbekraft einbüßt. Hier muß entweder die Probe verdünnt werden oder das Vergleichen nicht nach 24 Stunden geschehen, sondern nach 2—3 Stunden. Die Verbindung scheidet sich nämlich erst nach längerem Stehen ab. Je verdünnter die Stammlösung, um so genauer der Vergleich; es ist also zu empfehlen, bei mäßigem Indolgehalte des Kotes das Destillat mit einer 50 ccm hohen Schicht der Stammlösung zu vergleichen.

Man könnte daran denken, aus dem ganzen Destillat durch Ansäuern und Versetzen mit Natriumnitrit die Nitroindolverbindung zu gewinnen, indem man die Abscheidung durch Aus-

salzen mit Ammoniumsulfat befördert. Der Niederschlag könnte dann gesammelt werden, in Alkohol gelöst und die Nitroverbindung gewogen oder spektrophotometrisch bestimmt. Ich habe auch nach dieser Methode einige Untersuchungen gemacht, finde sie aber unpraktisch und erwähne diese Modifikation nur der Vollständigkeit halber.

Herrn Prof. Dr. Adolf Beck danke ich aufs wärmste für die Liberalität, mit welcher er das chemische Laboratorium und die Materialien mir zur Verfügung gestellt hat, und für sein freundliches Interesse, welches er meinen Arbeiten entgegenbrachte.
