

Über die quantitative Bestimmung flüchtiger Fettsäuren in den Faeces.

Von

Robert S. McCaughey aus Chicago.

(Aus der chemischen Abteilung des Pathologischen Instituts der Universität Berlin.)

(Der Redaktion zugegangen am 4. April 1911.)

Zum Zwecke einer Untersuchung, über die später berichtet werden soll, war die quantitative Bestimmung der flüchtigen Fettsäuren, der gebundenen sowohl, wie der freien, in den Faeces notwendig. Bevor ich meine Untersuchung begann, schlug mir Prof. E. Salkowski, unter dessen Anleitung die vorliegende Arbeit ausgeführt ist und dem ich an dieser Stelle herzlich danken möchte, vor, die für diesen Zweck angegebenen Methoden einer systematischen Prüfung zu unterziehen. Diese Methoden wurden entweder auf mit Wasser verrührte Faeces angewandt, oder auf alkoholische Extrakte, wie dies von Hoppe-Seyler empfohlen worden war.¹⁾ In beiden Fällen kann man verschieden vorgehen, und folgende Verfahren kamen in Betracht.

1. Destillation mit Mineralsäuren derart, daß in jedem Falle eine bestimmte Menge Destillat erlangt wird.

2. Gewöhnliche Destillation in der Absicht, die ganze Quantität der Säuren zu erhalten.²⁾

3. Destillation mit Dampf unter gewöhnlichem Druck.

4. Destillation im Vakuum.

5. Die in letzter Zeit von Welde³⁾ empfohlene Methode: Destillation bei gleichzeitiger Anwendung von Dampf und Vakuum.

Was die erste Methode betrifft, so kann man diese natürlich nur anwenden bei Vergleichsversuchen. Die gewöhnliche

Destillation der ganzen Säuremenge bis zum neutralen Übergang des Destillats wurde zuerst vorgenommen. Dieses Verfahren dauerte mehrere Tage, ohne daß ein vollständiger Neutralpunkt erhalten wurde. Während dieser Zeit aber findet Hydrolyse statt, außerdem destilliert bei 100° C. auch Milchsäure über, wie Welde zeigen konnte. Dies ist besonders wichtig für die Untersuchung von Säuglingsstühlen.

Vergleichsresultate dieser Methode werden wir später angeben.

Bezüglich der Dampfdestillation bei atmosphärischem Druck läßt sich derselbe Einwand erheben, d. h. in der erforderlichen, wenn auch etwas kürzeren Zeit tritt Hydrolyse ein. Der einzige Vorteil, der dieser Methode zukommt, ist die etwas kürzere Zeit, die sie beansprucht, und der Umstand, daß durch die Dampfkondensation die Flüssigkeit im Destillierkolben auf gleicher Menge erhalten wird.

Die Vakuumdestillation ist, wie wir sehen werden, sehr genau, wenn sie mit Alkoholextrakt ausgeführt wird. Über die Notwendigkeit der Anwendung eines alkoholischen Extraktes sind die Meinungen geteilt. Schmidt und Strassburger⁴⁾ bemerken: «Die Mehrzahl der Autoren, welche aus den Faeces die flüchtigen Fettsäuren darstellen, hielt jedoch eine vorhergehende Behandlung mit Alkohol nicht für erforderlich».

Wenn die Destillation im Dampf bei gewöhnlichem Druck mit alkoholischem Extrakt ausgeführt wird, wird Hydrolyse fast vollständig vermieden. Verwendet man 12—15 g Substanz, so ist die Destillation in etwa 5 Stunden vollendet.

Nach 1 Stunde verbraucht das Destillat 13,8 ccm n_{10} -NaHO

2 Stunden	»	»	»	3,4	»	»
3	»	»	»	3,2	»	»
4	»	»	»	2,4	»	»
5	»	»	»	1,8	»	»

Als ich im Begriff war, die Vakuumdestillation mit alkoholischem Extrakt auszuführen, erschien Welde⁵⁾ Arbeit, in der er seine Erfahrungen mit der Vakuumdampfmethodem beschrieb.

Nach Welde bietet diese Methode die großen Vorzüge der Genauigkeit und der schnellen Ausführbarkeit. Er gibt an,

daß erstens in der Destillationszeit von zwei Stunden nahezu quantitative Ausbeuten erhalten werden, zweitens daß andere in der Flüssigkeit vorhandene Substanzen, wie Eiweiß, Fette und Kohlenhydrate während der zweistündigen Destillationszeit unverändert bleiben. Diese Angaben sind gewiß zutreffend für die Bestimmung der freien flüchtigen Fettsäuren, keineswegs gelten sie aber für die quantitative Bestimmung der Gesamtsäure, d. h. außer den freien flüchtigen Fettsäuren derjenigen, die irgendwo im Darmkanal an Ammoniak oder an andere Kationen gebunden sind.

Zur Bestimmung der Gesamtacidität stellt sich *Welde* eine wässerige Aufschwemmung der Exkreme her, säuert sie mit Phosphorsäure (spez. Gew. 1,12) an und destilliert durch Vakuum und Dampf. Gegen dieses Verfahren möchte ich dasselbe einwenden, was *Welde* selbst gegen die gewöhnlichen Destillationsmethoden und gegen die von *Reichert* und *Meissl* ausgeführte Dampfdestillation einwendet: sie führen, wie schon *Schmidt* und *Strassburger* bemerken, zu keinem theoretischen Endpunkt, da unter der Einwirkung von Säure und 100° sowohl Fette als Eiweiß gerade diejenigen Säuren liefern können, die man doch in der Flüssigkeit als primär vorhanden nachweisen will. Diese Fehlerquelle wird durch Erhitzen auf 60° im Außenwasser anstatt auf 100° , wie *Welde* es vorschlägt, nicht ganz vermieden.

Der von mir benutzte Apparat stimmt mit dem von *Welde* angewandten überein, er unterscheidet sich nur dadurch, daß ich anstatt eines *Claisenkolbens* einen gewöhnlichen 2 l-Destillationskolben mit hoch angesetztem Seitenrohr verwende. Das Seitenrohr ist so gebogen, daß der Kolben schief gestellt werden kann, wodurch das Überlaufen des Inhaltes vermieden wird. Bei einem so hergerichteten Kolben verursacht das Schäumen des Inhalts auf Zusatz von Wasser keine Störung. Mit meinem Apparat vermochte ich in einer Stunde ungefähr 1450 ccm überzudestillieren. Da es nicht wünschenswert ist, eine so große Menge von Flüssigkeit zum Titrieren zu haben, könnte man es für ratsam halten, kleinere Kolben zu benutzen und den Dampf durch engere Röhren zu leiten. Doch empfiehlt sich dies nicht, denn sobald man etwas Kapillarähnliches zur

Dampfleitung benutzt, wird es von unlölichen Teilen verstopft und Wasser läuft über das Steigrohr des Dampfwicklungsapparates. Die Einschaltung des zweiten Gefäßes (vgl. den Apparat von Welde) ist durchaus nicht überflüssig.

Nachdem ich in mehreren Destillationen 50—90 g Faeces verwandt und gesehen hatte, daß man zur Destillation mehr als einen Tag braucht, nahm ich nur 5 g Faeces, suspendierte in 250 ccm Wasser, säuerte mit 10 ccm Phosphorsäure (1,3 spez. Gew.) an, destillierte unter 13 mm Druck bei 60° des Außenwassers.

Nach 1 Stunde verbraucht	12,4 ccm	$\frac{1}{10}$ -n-NaOH
» 2 Stunden	6,2	»
» 3	5,4	»
» 4	3,6	»
» 5	3,6	»
» 6	2,6	»
» 7	3,0	»
» 8	2,8	»

Diese Destillation erforderte unter fortdauernder Überwachung einen ganzen Tag und obgleich nur 5 g Faeces angewandt wurden, kam es zu keinem theoretischen Endpunkt.

Um zu sehen, inwieweit die Phosphorsäure von 1,3 D hydrolysierend wirkt, wurde folgender Versuch angestellt. 15 g Faeces wurden in Wasser verrieben und auf 1000 ccm aufgefüllt. Diese Suspension wurde in drei gleiche Teile geteilt. Diese erste Portion wurde mit 10 ccm Phosphorsäure von 1,12 D versetzt und mit Vakuum und Dampf unter 12½ mm Druck destilliert.

Das Destillat verbraucht nach 1 Stunde	5,4 ccm	$\frac{1}{10}$ -n-NaOH
» 2 Stunden	3,4	»
» 3	2,6	»
» 4	1,7	»
» 5	3,0	»
» 6	1,3	»

Total 17,4 ccm.

Wie man sieht, stehen die nach zwei Stunden erhaltenen Werte zu den anfänglich berechneten in so großem Verhältnis, daß man nicht weiß, wann man die Destillation abbrechen soll.

Die zweite Portion wurde mit 10 ccm Phosphorsäure von 1,3 spezifischem Gewicht angesäuert und durch Vakuum und Dampf destilliert, um den Grad der stattfindenden Hydrolyse zu ermitteln.

Nach 1 Stunde verbraucht	4,8 ccm	$\frac{1}{10}$ -n-NaOH
» 2 Stunden	4,0	»
» 3	6,4	»
» 4	3,4	»
» 5	5,2	»
» 6	3,3	»
» 7	3,8	»
Total	<u>30,9</u>	ccm.

Das Destillat ist hier nach 7stündiger Destillation fast ebenso sauer wie zu Beginn.

Die dritte Portion wurde durch gewöhnliche Destillation verarbeitet mit 10 ccm Phosphorsäure (1,12 spez. Gew.).

Nach 2 Stunden verbraucht	1,5 ccm	$\frac{1}{10}$ -n-NaOH
» 4	1,3	»
» 6	1,8	»
» 8	1,6	»

2. Tag.

Nach 10 Stunden verbraucht	0,7 ccm	$\frac{1}{10}$ -n-NaOH
» 14	0,5	»
» 16	0,5	»
» 18	0,4	»

Durch die Vakuumdestillation erhalten wir natürlich höhere Glieder der Fettreihe, was bei Destillation unter dem gewöhnlichen Atmosphärendruck bekanntlich nicht der Fall ist. Daraus erklärt sich bis zu einem gewissen Grade der Unterschied zwischen dem durch Vakuumdestillation mit 1,12 spez. Gew. der Phosphorsäure gewonnenen Resultat und dem durch gewöhnliche Destillation. Die durch Vakuum- und Dampfdestillation mit 1,30 spez. Gew. der Phosphorsäure gewonnenen Resultate

sind durch vermehrte Hydrolyse bedingt und zeigen, wie leicht die hydrolysierbaren Substanzen das Resultat beeinträchtigen können. Der Unterschied bei Anwendung von Phosphorsäure vom spez. Gew. 1,30 resp. 1,12 ist nur ein gradueller.

Wenn wir die Gesamtmenge flüchtiger Fettsäuren in Exkreten oder Sekreten genau bestimmen wollen, die hydrolysierbare Substanzen enthalten, müssen wir also letztere so vollständig wie möglich entfernen. Der Kot wird in einer vorher mit Glasstab abgewogenen Schale gewogen, dann zu gleichmäßiger Konsistenz verrieben. Zur Bestimmung der freien flüchtigen Fettsäuren wird nun eine bestimmte Menge des Kotes entnommen. Der Rest wird in einer Reibschale mit 96%igem Alkohol verrieben. Die ganze Masse wird nun in einem Kolben bis zum Sieden erhitzt, dann durch Absaugen filtriert, der Rückstand mit kochendem Alkohol gründlich gewaschen.

Das so erhaltene Alkoholextrakt wird nun geteilt, um die Zeit der Verdunstung und der Destillation abzukürzen.

Wenn die ursprüngliche Menge von Faeces 30 g oder weniger betrug, nehme ich die Hälfte des Alkoholextrakts, um in 2 Stunden zu destillieren. Hatte man 50—60 g Faeces und nimmt man die Hälfte des Extrakts, so dauert die Destillation 3 Stunden. Die Destillation der Hälfte des Extrakts von 75 g Kot wird etwa 4 Stunden dauern. Natürlich wird dies auch abhängen von der Menge der im Extrakt enthaltenen flüchtigen Fettsäuren. Nach Teilung des Extraktes wird normale NaOH-Lösung bis zur schwach alkalischen Reaktion hinzugefügt, dann bis zur Trockene auf dem Wasserbad verdampft. Der Rückstand wird mit Wasser aufgenommen, 10 ccm Phosphorsäure (1,12 spez. Gew.) werden hinzugefügt und durch Vakuumdampf destilliert. 96%iger Alkohol extrahiert fast vollständig die flüchtigen Fettsäuren. Nach Extraktion von 37 g Faeces wurde der Rest einer zweiten Extraktion unterworfen und destilliert. Nach 3 Stunden verbrauchten 1,1 ccm $\frac{1}{10}$ -NaOH.

Es gibt noch einen erheblichen Fehler der Vakuumdampf-methode, der der Korrektur bedarf. Dieser zeigt sich in dem folgenden Versuch.

4 ccm Essigsäure (30%) wurden mit Wasser bis auf 1 Liter

aufgefüllt. 100 ccm dieser verdünnten Lösung entsprechen 20,9 ccm $n_{/10}$ -NaOH. 100 ccm verdünnter Essigsäurelösung wurden mit NaOH neutralisiert, mit 10 ccm Phosphorsäure versetzt und mit Vakuum und Dampf destilliert.

Nach 1 Std. verbraucht:	15,7	ccm	$n_{/10}$ -NaOH
» 2 » »	4,5	»	»
» 3 » »	2,3	»	»
Total	22,5	ccm	»

Wir haben hier also einen Fehler von 1,6 ccm, der, wenn auch verhältnismäßig klein, doch als Titrationsfehler nicht mit unterlaufen dürfte. Demnächst extrahierte ich 5 g Faeces, alkalisierte, verdampfte, nahm mit Wasser auf, säuerte an und destillierte unter Vakuumdampf mit folgendem Resultat.

Nach 1 Std. verbraucht:	6,2	ccm	$n_{/10}$ -NOH
» 2 » »	2,2	»	»
» 3 » »	1,2	»	»
» 4 » »	1,2	»	»
» 5 » »	1,2	»	»

Weiterhin fügte ich zu destilliertem Wasser 10 ccm Phosphorsäure und destillierte mit Vakuum und Dampf. Destillat 1450 ccm.

Nach 1 Stunde verbraucht: 1,2 ccm $n_{/10}$ -NaOH.

Das letzte Experiment gab stets für dieselbe Menge des Destillats 1—1,2 ccm $n_{/10}$ -NaOH. Wir müssen daher für die vorhergehende Bestimmung von 5 g Faeces auf jede 1450 ccm des Destillats wenigstens 1,2 ccm $n_{/10}$ -NaOH subtrahieren, was nach 2 Stunden 6,0 anstatt 8,4 ergeben würde, was einen erheblichen Unterschied ausmacht. Bei dieser Fehlerquelle handelt es sich um den Einfluß von CO_2 , geringe Flüchtigkeit der Phosphorsäure und um den bei Titrierung einer größeren Flüssigkeitsmenge sich ergebenden Fehler. Wir müssen daher bei jeder Destillation das Destillat messen und den Fehler subtrahieren. Als Indikatoren versuchte ich Lackmoid-Malachitgrünlösung anstatt Phenolphthalein, aber zur Titrierung größerer Mengen Flüssigkeit mit relativ geringer Acidität ist die Endreaktion nicht genügend scharf.

Destilliertes Wasser aus dem Reservoir im Laboratorium durch Vakuumdestillation destilliert:

1450 ccm des Destillats verbrauchten 0,6 ccm n_{10} -NaOH.
 Destilliertes Wasser aufgekocht, um CO_2 zu entfernen, angesäuert mit 10 ccm Phosphorsäure. Nach 1 Stunde. 1450 ccm Destillats verbrauchten 0,8 n_{10} -NaOH.

Destilliertes Wasser + 10 ccm Phosphorsäure von 1,12 spez. Gew. Nach 1 Stunde.

1450 ccm Destillat verbrauchten 0,9 n_{10} -NaOH.

Vergleichsversuch von Vakuumdampf- und Vakuumdestillation ohne Dampf.

Eine Quantität Faeces, und zwar 33,5 g, wurde mit Alkohol extrahiert. Die Hälfte des Extrakts wurde durch Vakuum- und Dampfdestillation destilliert, die andere bei Vakuum ohne Dampf.

Vakuum- und Dampfdestillation:

Nach 1 Std. verbrauchten	1450 ccm Destillat	11,7 ccm n_{10} -NaOH
2 » »	1450 » »	2,7 » »
		<hr/>
		14,4 ccm »

Vakuumdestillation ohne Dampf:

Nach 1 Std. verbrauchten	800 ccm Destillat	8,8 ccm n_{10} -NaOH
2 » »	810 » »	3,6 » »
3 » »	815 » »	1,7 » »
		<hr/>
		14,1 ccm »

Ziehen wir nun 1,0 ccm für je 1450 ccm des Destillats ab, so erhalten wir 12,4 ccm für Vakuum- und Dampfdestillation und auch 12,4 ccm für Vakuumdestillation ohne Dampf. Erstere Methode bietet jedoch den Vorteil, das Resultat ein wenig schneller zu liefern.

Nach 2 Std. bei Vakuumdestillation 12,4 ccm n_{10} -NaOH.

2 » » » ohne Dampf 11,3 ccm.

Vergleichsversuch bei Vakuumdestillation mit Benützung von Phosphorsäure vom spez. Gew. 1,12 resp. 1,3.

101,5 g Faeces werden mit Alkohol extrahiert und in zwei Teile geteilt.

Teil I wird mit Phosphorsäure vom spez. Gew. 1,12 angesäuert.

Nach 1 Std.	1450 ccm	verbrauchten	45,8 ccm	$n_{/10}$ -NaOH
» 2 »	1450 »	»	9,6 »	»
» 3 »	1450 »	»	2,6 »	»
» 4 »	1450 »	»	1,5 »	»
			<hr/>	
			59,5	— 4 = 55,5 ccm.

Teil II wird mit Phosphorsäure vom spez. Gew. 1,3 angesäuert.

Nach 1 Std.	1450 ccm	verbrauchten	48,2 ccm	$n_{/10}$ -NaOH
» 2 »	1450 »	»	10,0 »	»
» 3 »	1450 »	»	3,5 »	»
» 4 »	1450 »	»	2,0 »	»
			<hr/>	
			63,7	— 4 = 59,7 ccm.

Vergleicht man diese Resultate, so haben wir bei Anwendung der Phosphorsäure mit 1,3 spez. Gew. 4,2 ccm $n_{/10}$ -NaOH mehr gebraucht, als bei Anwendung der Phosphorsäure mit spez. Gew. 1,12. Der Alkohol löst etwas Fett und die stärkere Säure hydrolysiert dieses in solch einem Grade. Wir bemerken auch, daß die Destillation bei Gebrauch von Säure mit 1,12 spez. Gew. ebenso schnell beendet ist, als bei Anwendung der anderen Säure. Wir werden also durch erstere Säure (1,12 spez. Gew.) exaktere Resultate erlangen.

Die Vakuumdampfmethod, wie sie zuerst von Welde für die quantitative Bestimmung freier, flüchtiger Fettsäuren angewandt wurde, ist, abgesehen von dem kleinen durch Schwankungen im Vakuum durch die Dampfentwicklung und durch geringe Mengen von Milchsäure bedingten Fehler, ziemlich genau, wenn die oben erwähnte Korrektur für CO_2 und flüchtige Phosphorsäure angebracht wird. Für die Bestimmung der Gesamtacidität ist sie jedoch ungenau und das Verfahren dauert viele Stunden.

Durch Darstellung eines alkoholischen Extrakts in der oben angegebenen Weise und durch Vakuumdampfdestillation erlangt man schon in 2 Stunden Resultate (wobei die erhebliche Menge von 30 g Exkrementen

angewandt wird), die fast übereinstimmend genau sind. Bei Destillation einer wässerigen Aufschwemmung, wie Welche dieses tut, unter Vakuumdampf mit Phosphorsäure vom spez. Gew. 1,12, ist es unmöglich, eine Endreaktion in 2 Stunden zu erhalten, wenn man auch nur 5 g Substanz nimmt.

Zur Bestimmung der gesamten Quantität der flüchtigen Säuren empfiehlt sich also ausschließlich die Herstellung eines alkoholischen Auszuges (in der früher angegebenen Weise) und die Destillation mit Vakuum und Dampf unter Zusatz von 10 ccm Phosphorsäure von 1,12 D.

Zum Schlusse möchte ich die Ergebnisse meiner Untersuchung kurz zusammenfassen.

Die bisherigen Methoden zur Bestimmung der flüchtigen Fettsäuren in den Faeces geben keine zuverlässigen Resultate. Ich empfehle daher in Zukunft folgendes Verfahren, das sich mir als durchaus zweckmäßig erwiesen hat, in Anwendung zu bringen.

Der Kot wird in einer vorher mitsamt dem Glasstab abgewogenen Schale gewogen, dann zu gleichmäßiger Konsistenz verrieben.

Zur Bestimmung der freien, flüchtigen Fettsäuren wird nun eine bestimmte Menge des Kotes entnommen. Zur Bestimmung der gesamten flüchtigen Fettsäuren werden ungefähr 25—30 g genau gewogen, mit etwa 250—300 ccm 96% igem Alkohol in einer Reibschale verrieben. Die ganze Masse wird nun in einem Kolben bis zum Sieden erhitzt, dann durch Absaugen filtriert, der Rückstand mit kochendem Alkohol gründlich gewaschen. Das so erhaltene Alkoholextrakt wird nun in zwei Teile geteilt, um die Zeit der Verdunstung und der Destillation abzukürzen.

Nach Teilung des Extraktes wird $\frac{1}{1}$ -normal-NaOH bis zur schwach alkalischen Reaktion hinzugefügt, dann bis zur Trockene auf dem Wasserbad verdampft. Der Rückstand wird mit destilliertem Wasser aufgenommen, 10 ccm Phosphorsäure (1.12 spez. Gew.) werden hinzugefügt und durch Vakuum und Dampf destilliert. Das Destillat wird gemessen und mit $\frac{2}{10}$ -

150 Robert S. McCaughey, Über Bestimmung flüchtiger Fettsäuren.

NaOH titriert unter Verwendung von Phenolphthalein als Indikator. Von der Anzahl der für die Neutralisierung nötigen Kubikzentimeter wird der durch Gegenwart von CO_2 und Flüchtigkeit der Phosphorsäure bedingte Fehler abgezogen, und zwar beträgt letzterer in der Regel 1 ccm $\text{n}/_{10}$ -NaOH pro je 1400 bis 1500 ccm Destillat.

Literatur.

1. Hoppe-Seyler-Thierfelder, Handbuch der chem. Analyse, 1909, S. 69.
 2. Ury, Deutsche medizinische Wochenschrift, 1904, Nr. 19.
 3. Welde, Biochemische Zeitschrift, Bd. XXVIII, S. 505.
 4. Schmidt und Strassburger, Die Faeces des Menschen, 1910, S. 224.
 5. l. c.
-