

(Aus dem Gerichtsärztlichen Institut der Universität Breslau.
Direktor: Prof. Dr. *Karl Reuter*.)

Die Ausmüttlung extrahierbarer Giftstoffe durch Gefrierverfahren¹.

Von
Priv.-Doz. Dr. med. et jur. **Otto Schmidt.**

Mit 3 Textabbildungen.

Während seiner Hamburger Tätigkeit studierte *Karl Reuter* die Einwirkung der Kälte auf die Struktur tierischer Organe. An Hand experimenteller Untersuchungen konnte er feststellen, daß der zeitliche Ablauf des Gefrierens für die Erhaltung der natürlichen Struktur der Organelemente von ausschlaggebender Bedeutung ist. Schnelles Gefrieren ändert die Organstruktur nicht wesentlich. Es ist dies eine Tatsache, die uns aus der mikroskopischen Gefriertechnik geläufig ist. Bei langsamem Einfrieren zeigen sich an den Organen jedoch erhebliche Veränderungen ihrer Gewebsstruktur.

„Bei Gefrieren frischer protoplasmatischer, tierischer, vermutlich auch pflanzlicher Gewebe“, so sagt *Karl Reuter*, „spielen sich bei gleichmäßiger Abkühlung die physikalisch-chemischen, in festem Abhängigkeitsverhältnis zur Gefriereschwindigkeit stehenden Dissoziationsvorgänge (Ionenwanderungen und kolloidale Trennungerscheinungen) von vornherein isoliert im Innern einer jeden Körperzelle ab und liefern gegebenenfalls den Dimensionen der letzteren angepaßte, feine gewebliche Strukturveränderungen. Der Zellorganismus, als somit noch aktiv morphologisch bestimmender Faktor, kann bei zunehmender Verlangsamung des Abkühlungsprozesses und bei Gegenwart überwiegender Flüssigkeitsmengen unter Sprengung der Zellgrenzen so vollständig ausgeschaltet und beiseite gedrängt werden, daß er morphologisch nur noch die Rolle eines passiven Fremdkörpers innerhalb der zusammenhängend abgeschiedenen Gewebsflüssigkeit spielt, die darauf als Ganzes den Kristallisationsgesetzen unterliegt. Die Grenze der Gefrierungsverlangsamung, bis zu welcher die Körperzelle das histologische Bild beherrscht, ist bei verschiedenen Geweben naturgemäß verschieden, aber beeinflußt durch den jeweiligen Wassergehalt, die Zellgröße und die Dehnbarkeit der Zellmembran.“

¹ Herrn Prof. Dr. *Karl Reuter* zum 2. III. 1933, seinem 60. Geburtstage, gewidmet.

Diese Untersuchungsergebnisse bildeten die Grundlage für ein Verfahren zur Ausmittlung extrahierbarer Giftstoffe. Das Verfahren beruht auf der Möglichkeit, durch langsames Einfrieren krystalloid und kolloid gelöste Stoffe genügend weitgehend voneinander zu trennen.

Die Vorgänge, die sich bei langsamem Einfrieren innerhalb der Zellen und Gewebe abspielen, folgen rein physikalischen Gesetzen. Physikalisch betrachtet, enthält die Zelle neben krystalloid gelösten Salzen Eiweißstoffe in kolloidaler Lösung.

Die Gefriervorgänge an Salzlösungen sind hinlänglich genau studiert. Reines Wasser gefriert bei 0° . Der Gefrierpunkt von Salzlösungen liegt bekanntlich tiefer. Je konzentrierter die Lösung, je tiefer liegt diejenige Temperatur, bei der sich aus der Lösung Eiskristalle abzuscheiden beginnen. Bei einer 1proz. Kochsalzlösung liegt dieser Punkt beispielsweise bei $-0,58^{\circ}$. Wird weiter unterkühlt, scheidet sich aus der Lösung reines, salzfreies Wasser in Eisform ab. Die Salzlösung wird entsprechend konzentrierter. Ihr Gefrierpunkt sinkt weiter herab, bis schließlich eine gesättigte Salzlösung resultiert. Bei weiterer Unterkühlung frieren aus der Lösung nunmehr Eis und Salz in konstantem Verhältnis als einheitlicher Körper aus. Dieser Gefrierpunkt der gesättigten Lösung, bei dem sich die Eiskurve und Sättigungskurve schneiden, wird als kryohydratischer Punkt bezeichnet. Er liegt bei Kochsalzlösung beispielsweise bei $-21,2^{\circ}$.

Innerhalb einer Zelle hat man bei langsamem Gefrieren die gleichen Veränderungen zu erwarten. Es scheidet sich zunächst innerhalb der Zelle reines Wasser in kristallinischer Form ab. Erst bei tieferen Temperaturen gefrieren Eis und Salze als einheitlicher Körper. Beim Auftauen aus diesem Zustande gehen die Salze wiederum in Lösung. Die erlittene Zustandsänderung ist reversibel. Wässrige Lösungen von Alkaloiden und synthetischen Giftstoffen verhalten sich beim Einfrieren wie krystalloid gelöste Salze. Bei langsamem Einfrieren sammeln sich diese Stoffe im Zentrum des Eiskörpers an. Nach dem Auftauen gehen sie wiederum unverändert und restlos in Lösung.

Im Gegensatz zu den krystalloiden zeigen kolloide Lösungen beim Einfrieren ein sehr unterschiedliches Verhalten. Viele Kolloide erleiden hierbei eine irreversible Zustandsänderung, so daß sie nach dem Auftauen nicht mehr als Kolloidlösungen fortbestehen, sondern sich als lose Gallerte, feines Pulver oder in Form von Plättchen ausscheiden (*Zsigmondy*). Platin- und Goldsolle fallen beispielsweise beim Gefrieren aus. Ebenso werden Arsentrisulfid und Eisenhydroxyd aus ihren Lösungen gefällt. Einige Farbstoffe zeigen nach Abkühlung eine Farbabschwächung. Eine 10proz. Tanninlösung geht erst nach geringer Temperaturerhöhung der aufgetauten Flüssigkeit wieder in Lösung. Eine mit Lugol blaufarbte Lösung von Weizenstärke reichert sich

beim langsamen Gefrieren in der Mitte an (Abb. 1). Nach dem Auftauen bleibt die Stärkelösung, wie wir bei unseren Versuchen sahen, dauernd flockig. Durch Filtrieren läßt sich eine völlig wasserklare, stärkefreie Lösung gewinnen. Erst durch erneutes Aufkochen wird die einmal ausgefrorene, flockige Stärkelösung wieder in eine homogene, blaue Lösung verwandelt. Ähnlich verhält sich eine Gelatinelösung. Die ersten Mengen Flüssigkeit enthalten nichts von dem gelösten Stoff. Nach völligem Auftauen ist die Substanz noch ausgesprochen inhomogen, aus einer klumpigen Gallerte bestehend. Diese Erscheinung geht bei Zimmertemperatur, selbst innerhalb 48 Stunden, fast gar nicht zurück. Eine wässrige Hämoglobinelösung zeigt nach dem Auftauen keine deutliche Veränderung. Auch eine dialysierte wässrige Lösung von Blutserum sahen wir nach dem Auftauen nicht merklich verändert. Man kann im allgemeinen sagen, daß ein Kolloid beim Gefrieren um so beständiger ist, je stabiler



Abb. 1.

es sich sonst auch gegenüber Einflüssen von Elektrolyten oder gegenüber Wasserentziehung beim Eintrocknen verhält (*Zsigmondy*).

Die von *K. Reuter* zuerst beschriebenen Veränderungen der Organe durch Anwendung von Kälte und die dadurch bedingte reichliche Ausscheidung von krystallisiertem reinem Wasser innerhalb der Zellen und Zellelemente sowie das durchaus verschiedenartige Verhalten von Krystalloiden und Kolloiden beim Einfrieren legten den Gedanken nahe, durch langsames Einfrieren eine Trennung von Krystalloiden und Kolloiden in zelligen Organelementen vorzunehmen. Auf Grund dieser Überlegungen schien die Anwendung eines entsprechenden Gefrierverfahrens für die Ausmittlung von krystalloiden Giftstoffen, die bisher vorzüglich durch Extraktion gewonnen werden, aussichtsreich. Eine nach den Angaben von Prof. *Reuter* in dem Leichenkeller unseres Institutes eingerichtete Gefrieranlage ermöglichte es, unsere Versuche und Analysen unabhängig von der Jahreszeit vorzunehmen.

Die Strukturveränderungen, die sich an tierischen und menschlichen Organen bei langsamem Gefrieren zeigen, sind sehr auffallend. *K. Reuter* veröffentlicht hierüber eine Reihe sehr anschaulicher Bilder und schematische Darstellungen. Bei genügend langsamem Einfrieren können die zelligen Bestandteile eines Organs derartig beiseite gedrängt werden und zurücktreten, daß sie, wie *K. Reuter* sagt, „morphologisch nur noch die Rolle eines passiven Fremdkörpers innerhalb der zusammenhängend abgeschiedenen Gewebsflüssigkeit spielen“.

Nach dem Auftauen stellt sich die normale Organstruktur nicht sobald wieder ein. Abb. 2 zeigt eine menschliche Leber, die 2 Stunden

nach vollständigem Auftauen in 10proz. Formalinlösung gehärtet und nach Einbetten in Paraffin mikroskopisch verarbeitet wurde. Die Leberzellbalken erscheinen deutlich auseinandergerückt und zusammengepreßt. Es ist erklärlich, daß die in den Maschen abgeschiedene Ge-

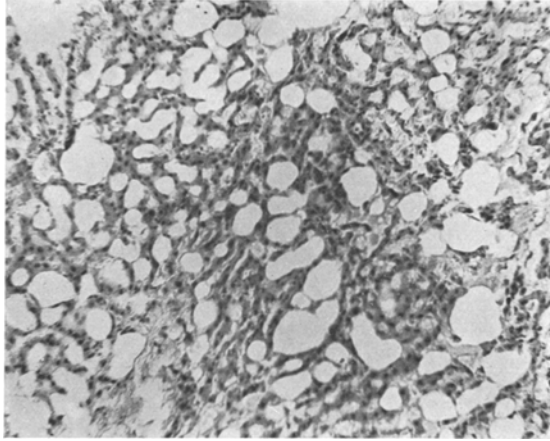


Abb. 2.

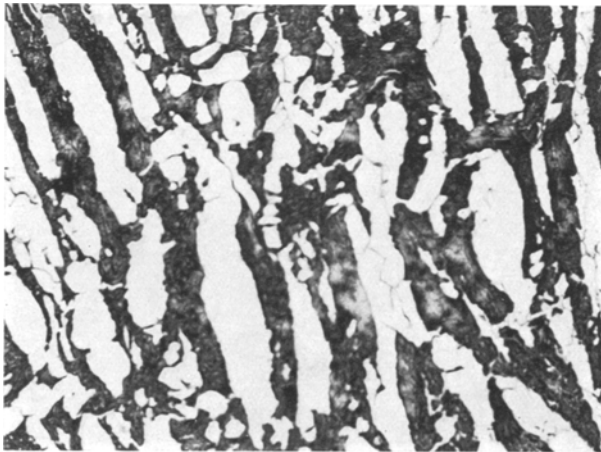


Abb. 3.

websflüssigkeit aus ihrer Umgebung leicht die durch das Gefrieren löslich gebliebenen krystalloiden Stoffe in sich aufnehmen wird. Abb. 3 zeigt ein gleiches Bild von einem menschlichen Herzen, das 24 Stunden nach vollständigem Auftauen in 10proz. Formalinlösung gehärtet und in Paraffin eingebettet wurde. Auch hier ist das Vorhandensein größerer

Hohlräume, die ehemals durch Eismassen ausgefüllt waren, deutlich. Die Organe waren 24 Stunden einer Temperatur von -10 bis -15° ausgesetzt.

Welche kolloide Eiweißstoffe der zelligen Organelemente nunmehr im einzelnen durch das Gefrierverfahren in einen irreversiblen Fällungszustand überführt werden, haben wir nicht näher untersucht. Wir sind auch der Frage nicht weiter nachgegangen, ob die eingetretene Zustandsänderung in der Tat eine dauernde ist. Maßgebend für uns war die Frage, ob die durch das Einfrieren erzielte Trennung zwischen krystalloid und kolloid gelösten Substanzen eine genügend weitgehende ist, daß sie für die Ausmittlung krystalloider Giftstoffe nutzbar gemacht werden könnte.

Läßt man langsam gefrorene Organe in einer Schale auftauen, so sammelt sich nach dem Auftauen die ehemals gefrorene Gewebsflüssigkeit mehr oder minder reichlich in der Schale an. Die Organe haben nach dem Auftauen ihre natürliche Festigkeit verloren. Sie erscheinen schlaff und welk. Reichlicher wird die Flüssigkeitsansammlung, wenn man die gefrorenen Organe in Stücke zerlegt.

Bei unseren Versuchen sind wir in der Weise verfahren, daß wir die zu untersuchenden Organe 24—48 Stunden oder noch länger einer Außentemperatur von -10 bis -15° aussetzten. Die Organe wurden zerstückelt und nach vollständigem Auftauen in ein angefeuchtetes Koliertuch geschlagen. Sie wurden in einer Art Fruchtpresse gründlich ausgepreßt. Es läßt sich auf diese Weise selbst aus den drüsigen Bauchorganen wie Leber, Nieren, Milz leicht die Hälfte des ursprünglichen Gewichtes an Preßsaft gewinnen. Die so ausgepreßten Organe werden mit Wasser gründlich nachgespült. Der gewonnene Preßsaft stellt eine stark blutig gefärbte Flüssigkeit dar. Er enthält neben den in Lösung gegangenen Krystalloiden noch reichlich Eiweißstoffe.

Zur Entfernung der Eiweißstoffe haben wir uns eines Verfahrens bedient, das gegenüber dem bisher üblichen Stass-Ottoschen Reinigungsverfahren den großen Vorzug eines schnelleren und ebenso zuverlässigen Arbeitens bietet. Der Preßsaft wird mit einigen Tropfen verdünnter Salzsäure schwach angesäuert und unter ständigem Umrühren in einem genügend großen Becherglase zum Sieden erhitzt. Nach dem Erkalten wird die Lösung von den koagulierten Eiweißstoffen durch Filtrieren befreit. Der Filtrückstand wird mit Wasser nachgespült und gründlich abgepreßt. Das Filtrat besteht nunmehr aus einer klaren, gelblichen Flüssigkeit. Zur vollständigen Entfernung der Eiweißstoffe wird das Filtrat mit 2—3 Löffel Infusorienerde vermennt und in einem zerlegbaren Vakuumdestillierapparat zur vollständigen Trockne gebracht. Der trockene Rückstand wird fein zerrieben und mit Alkohol, der über Chlorcalcium gründlich entwässert ist, extrahiert. Die Bildung von

klumpigem koaguliertem Eiweiß läßt sich auf diese Weise verhindern. Die weitere Verarbeitung weicht von der bisher üblichen Methode nicht wesentlich ab. Die alkoholische Lösung wird filtriert, der Alkohol verdampft, der Rest mit Wasser aufgenommen, die wässrige Lösung auf dem Wasserbade längere Zeit erhitzt und zur Entfernung der Fettstoffe in der Kälte durch ein angefeuchtetes Filter filtriert. Die Isolierung und Trennung der einzelnen Giftstoffe erfolgt nach dem üblichen Ausschüttelungsverfahren aus saurer, alkalischer und ammoniakalischer wässriger Lösung.

Größere Verluste an Substanz sind bei der Art dieses Vorgehens nicht zu erwarten. Wir versetzten den Preßsaft gefrorener Organe mit einer bestimmten Menge verschiedener Gifte. Bei den forensisch wichtigsten Barbitursäurederivaten erhielten wir eine nahezu quantitative Ausbeute. Der Verlust lag nicht über 5%. Ähnlich gute Ausbeute erhielten wir bei Alkaloiden. Wir unternahmen entsprechende Versuche mit Strychnin, Atropin, Chinin und Morphinum.

Die Verwendbarkeit dieses Ausmittlungsverfahrens für die forensische Praxis überprüften wir an geeigneten Fällen unseres Sektionsmaterials, an entsprechenden gerichtlichen Aufträgen zugesandter Asservate und an Hand des Tierversuchs. Gleiche Organmengen wurden nach dem Stass-Ottoschen Reinigungsverfahren und dem beschriebenen Gefrierverfahren untersucht.

In einem Fall von Veronalvergiftung einer weiblichen Selbstmörderin, die unter den Erscheinungen schwerer Benommenheit nach 12 Stunden verstorben war, isolierten wir aus 500 g Leber nach dem Stass-Ottoschen Verfahren 0,07 g, nach dem Gefrierverfahren aus den gleichen Organmengen 0,11 g Veronal. In einem ähnlich liegenden Fall von Veronalvergiftung erhielten wir aus 400 g Leber bei dem bisher üblichen Extraktionsverfahren 0,09 g, und bei dem Gefrierverfahren etwa gleiche Mengen an Substanz. In einem Fall fraglicher Luminalvergiftung erhielten wir ähnlich gleichliegende Werte.

Alkaloidvergiftungen hatten wir in letzter Zeit nur wenige zu verarbeiten Gelegenheit. In dem einen Falle isolierten wir aus 500 g Leichenorganen bei dem Stass-Ottoschen Verfahren 0,07 g Morphinum. Im Gefrierverfahren erhielten wir 0,10 g. Es gelang uns mit Hilfe des Gefrierverfahrens aus den Leichenteilen eines 7 Wochen alten Kindes, das zwei Teeaufgüsse unreifer, getrockneter Mohnkapseln erhalten hatte, etwa 10 mg einer Substanz zu isolieren, die sowohl nach ihrem chemischen als auch biologischen Verhalten als Morphinum zu identifizieren war.

Wir überprüften im weiteren die Brauchbarkeit des Verfahrens durch einen geeigneten Tierversuch. Ein 17 kg schwerer Hund wurde durch intrathorakale Injektion von 0,1 g Strychnin vergiftet. Das Tier

verstarb nach etwa 5 Minuten. Leber, Nieren, Milz und Herzblut wurden untersucht. Das Stass-Ottosche Verfahren ergab einen Chloroform-Alkoholverdunstungsrückstand, der noch sehr reichlich durch Schmieren verunreinigt war. Die nochmals ausgeschüttelte, nunmehr analysenfertige Substanz wog 7 mg. Durch das Gefrierverfahren dagegen gelang es, aus den gleichen Organmengen 13 mg Substanz zu isolieren, die bei der ersten Ausschüttelung wesentlich reiner in Form schön ausgebildeter Krystalle analysenfertig vorlag.

Wir haben uns in letzter Zeit für den Nachweis extrahierbarer Giftstoffe fast ausschließlich des Gefrierverfahrens bedient und eine größere Zahl von entsprechenden Analysen durchgeführt. Nach unseren Erfahrungen ist durch langsames Einfrieren von Organen eine genügend weitgehende Trennung zwischen krystalloid und kolloid gelösten Stoffen zu erzielen. Die synthetischen Giftstoffe und Pflanzengifte verhalten sich wie krystalloid gelöste Substanzen. Sie gehen nach dem Auftauen wiederum vollständig in Lösung. Zur Ausmittlung krystallinischer extrahierbarer Giftstoffe ist das Verfahren durchaus geeignet und bietet sogar gegenüber dem bisher üblichen Extraktionsverfahren gewisse Vorteile.

Die Art des beschriebenen Vorgehens unter Anwendung von Infusorienerde umgeht das zeitraubende Arbeiten durch mehrfaches Extrahieren und erneutes Abdestillieren mit Alkohol in steigender Konzentration. Sie ermöglicht es, innerhalb weniger Stunden die Reinigung bis zur Ausschüttelung vorzunehmen. Bei dem Ausschütteln selbst haben wir lästige Emulsionen nie beobachtet, obgleich wir Untersuchungen selbst an hochfaulen Organen vornahmen. Die gewonnenen Rückstände sind nach unseren Erfahrungen wesentlich weniger von lästigen Schmierern durchsetzt als bei dem Stass-Ottoschen Verfahren. Die isolierte Substanz krystallisiert meist in einem derartigen Reinheitsgrade aus, daß sie sich ohne weiteres für die qualitative und quantitative Analyse eignet.

Literaturverzeichnis.

- Reuter, K.*, Die Konservierung von Fischen durch das Gefrierverfahren. Teil II. Abhandlungen zur Volksernährung. Berlin 1916 — Über die Verwendung der Kälte in der anatomischen Technik. Z. angew. Anat. **2**, H. 4 u. 6 — Erfahrungen an gefrorenen Leichen. Dtsch. Z. gerichtl. Med. **1**, H. 6 (1922) — Sobre La Importancia De La Velocidad De Congelacion Para La Conversacion De Los Tejidos De La Carne y Del Pescado. Sociedad Rural Argentina. Buenos Aires 1923. — *Zsigmondy, Richard*, Kolloidchemie. Leipzig 1925.