

Aus dem Institut für gerichtliche und soziale Medizin der Universität
Marburg a. d. Lahn (Direktor: Prof. Dr. FÖRSTER).

Neue Ausmittelungs- und Identifizierungsverfahren für organische Gifte.

II. Mitteilung.

Alkaloide.

Von

H.-J. GOLDBACH und R. OPFER-SCHAUM.

Mit 4 Textabbildungen.

In der I. Mitteilung wurde ein schnell arbeitendes Mikroverfahren zum toxikologischen Nachweis von Barbitalen und Analgetica beschrieben¹. Wir haben jetzt auch versucht, das zum toxikologischen Nachweis der Alkaloide recht umständliche Verfahren nach STAS-OTTO durch eine schnellere und einfacher arbeitende Methode zu ersetzen. Vor längerer Zeit wurde von FLORENCE^{2, 3} ein Ausmittelungsverfahren angegeben, das zur Fällung der Eiweißstoffe Trichloressigsäure verwendet. Dieses Verfahren wurde für den qualitativen Giftnachweis von uns vereinfacht. Über die Menge der in Arbeit zu nehmenden Organteile lassen sich keine bindenden Angaben machen. FLORENCE geht von 300 g Untersuchungsmaterial aus. Bei Alkaloiden, die erst in großen Dosen zu Vergiftungen führen (z. B. Coffein, Theobromin) und solchen, für die empfindliche Mikromethoden zur Verfügung stehen, kamen wir mit wesentlich kleineren Mengen aus.

Arbeitsvorschrift.

Die Leichenteile werden in einer Porzellanschale mit Quarzsand fein zerrieben und nach und nach $\frac{2}{3}$ der Menge an Untersuchungsmaterial 20%ige Trichloressigsäurelösung zugefügt. Man knetet mit dem Pistill gut durch, bis alles Eiweiß gefällt ist und die Masse eine graue Färbung angenommen hat. Dann hält man sie 15 min bei 35° auf dem Wasserbad. Hierauf wird filtriert und das klare Filtrat in üblicher Weise ausschüttelt.

I. Beim Alkalisieren mit Natronlauge und Ausschütteln mit Äther gehen die meisten Alkaloide in den Äther über.

II. Nachfolgendes Ausschütteln mit Chloroform erfaßt: Coffein, Narkotin, Strychnin, Theobromin, Theophyllin.

III. Morphin und Apomorphin lassen sich der wäßrigen Flüssigkeit nach schwachem Ansäuern mit Salzsäure und nachfolgendem Alkalisieren mit Ammoniakflüssigkeit mit einer Mischung aus 85 Teilen Chloroform und 15 Teilen Isopropylalkohol entziehen.

Die Alkaloidlösung wird mit entwässertem Natriumsulfat getrocknet.

Eine Reinigung kann bei Bedarf in üblicher Weise erfolgen, indem man nach Abdestillieren des Lösungsmittels den Rückstand kalt mit salzsäurehaltigem Wasser durchröhrt. Man filtriert ungelöst bleibende Verunreinigungen ab, macht das Filtrat alkalisch, nimmt die Alkaloide wieder im organischen Lösungsmittel auf und trocknet mit entwässertem Natriumsulfat.

Wo dies nur angängig ist, versuchen wir durch Mikrosublimation das schmelzpunktreine Alkaloid zu erhalten. Wir benutzen dabei das von R. OPFER-SCHAUM⁴ angegebene Sublimiergerät in Verbindung mit dem in unserer I. Mitteilung beschriebenen und abgebildeten Mikroschmelzpunktbestimmungsapparat. Wie R. OPFER-SCHAUM⁵ vor kurzem mitteilte, lässt sich eine ganze Reihe von Alkaloiden, bei denen in der Handbuchliteratur meist der Nachweis durch Vakuumsublimation vorgeschlagen wird, so in einfacher Weise in reinem Zustand gewinnen. Durch die mikroskopische Beobachtung des Sublimationsvorganges werden gleichzeitig wertvolle Anhaltspunkte für die Identifizierung gewonnen (s. Abb. 1 und 2, S. 438 und Spalte 2 der Tabelle 1).

Die Alkaloidlösung wird nach vorherigem Einengen auf 1—2 cm³ mittels einer Glascapillare vorsichtig in den Schliff eines Hohlschliff-objektträgers getropft, der über einem Kupferring von 10 mm Höhe, 12 mm äußerem und 6 mm innerem Durchmesser auf dem entsprechend erwärmtten Heiztisch des Mikro-Schmelzpunktbestimmungsapparates liegt. Es wird so ein „Kriechen“ des Lösungsmittels über den Rand des Schliffes vermieden. Dann legt man ein Deckglas über den Hohlschliff, bringt den Objektträger auf den Heiztisch und sublimiert wie früher beschrieben. Beim Auftreten der ersten Sublimate am Deckglas liest man die Temperatur ab. (Diese ist in Spalte 1 der Tabelle angegeben.)

Zur Erzielung schöner Sublimate wird bei gleichbleibender Temperaturinstellung einige Zeit langsam weiter sublimiert, wobei man möglichst tief unter dem Schmelzpunkt der sublimierten Substanz bleibt. Einige Alkaloide, z. B. das Koffein, sublimieren immer sofort in deutlichen Krystallen. Bei anderen erscheinen oft zunächst nur Tröpfchen am Deckglas. Es wird deshalb beim Auftreten des ersten feinen Beschlags das Deckglas abgehoben, zur Anregung der Krystallisation mit einer Lanzettnadel gekratzt, dann wieder aufgelegt und weitersublimiert.

Die eigentliche Charakterisierung muß durch die physikalischen Methoden der Schmelzpunkt-Mikrobestimmung und der Bestimmung der eutektischen Temperatur mit einer Testsubstanz vorgenommen werden.

Die Mikroschmelzpunkte der Alkaloide sind in Spalte 3 der Tabelle angeführt, sie sind zum Teil (z. B. Dicodid, Eukodal) noch nicht in den Tabellen von KOFLER⁶ enthalten. Besonders zu achten ist auf das Auftreten instabiler polymorpher Formen. Diese wandeln sich meist vor

Erreichen ihres Schmelzpunktes wieder in die stabilen Modifikationen um. Einzelne bei der Sublimation entstandene instabile Formen sind jedoch so haltbar, daß sich ihre Schmelztemperatur beobachten läßt (z. B. Dicodid). Die Schmelzpunkte solcher instabilen Modifikationen sind in der Tabelle in Klammern beigelegt.

Auch bei den sehr geringen Mengen zu analysierender Substanz, wie sie manchmal bei toxikologischen Untersuchungen anfallen, erhält man durch die Mikrosublimationsmethode so viel Reinsubstanz, daß sich eine Mikro-Mischschmelzpunktbestimmung zur Sicherung der Analyse durchführen läßt. Steht die Alkaloidbase nicht zur Verfügung, so gewinnt man sie aus einer kleinen Menge Alkaloidsalz, indem man diesem ein Tröpfchen Lauge zufügt und aus dem Hohlschliffobjektträger sublimiert. Als Rezipient wird dabei ein Objektträger benutzt. Man braucht dann für die Mischschmelzpunktbestimmung nur das Deckglas mit den aus dem Untersuchungsmaterial erhaltenen Krystallen über diesen Objektträger zu legen und durch Hin- und Herschieben des Deckglases unter Andrücken Kontakt zwischen der zu analysierenden Substanz und der Vergleichsprobe herzustellen.

Zur weiteren Charakterisierung der Mikrosublimate läßt sich die Bestimmung der eutektischen Temperatur mit einer Testsubstanz heranziehen. Man bringt einige Kräckelchen Dicyandiamid ($F = 210\text{--}212^\circ\text{C}$) auf einen Objektträger, legt darüber das Deckglas mit dem Mikrosublimat, vermischt unter Andrücken durch Hin- und Herschieben und bestimmt den Schmelzbeginn des Gemisches. Die eutektischen Temperaturen sind mindestens ebenso gut reproduzierbar wie die Schmelzpunkte, sie sind in Spalte 4 der Tabelle angegeben.

Bei hochschmelzenden Alkaloiden, die schon weit unter ihrem Schmelzpunkt stark flüchtig sind (z. B. Coffein, Theophyllin, Theobromin, Eukodal), kommt es vor, daß das Mikrosublimat sich bei der Schmelzpunktbestimmung vor Erreichen der Schmelztemperatur verflüchtigt. In diesen Fällen, sowie bei Alkaloiden, die unter Zersetzung schmelzen, nimmt man die Identifizierung der Mikrosublimate, wie dies schon früher von R. OPPFER-SCHAUM⁷ vorgeschlagen wurde, nur durch die Bestimmung der eutektischen Temperatur mit einer Testsubstanz vor und führt diese zur Sicherung der Kennzeichnung als Mischprobe^{4, 8} durch. Man gibt auf den Objektträger einige Kräckelchen der Testsubstanz und der vermuteten Substanz. Dann legt man das Deckglas mit dem zu analysierenden Sublimat darüber, schiebt es zur Vermischung einige Male leicht hin und her und erhitzt unter dem Heizmikroskop. Bei Identität von nachzuweisender und der zur Testsubstanz gemischten Substanz beginnt das Gemisch bei der in Spalte 4 der Tabelle 1 verzeichneten binären eutektischen Temperatur zu schmelzen. Befindet sich aber ein anderes Alkaloid am Deckglas als die zur Testsubstanz gemischte Base,

Tabelle 1.

Substanz	Sublimationsbeginn °C	Aussehen der Sublimate	Mikro F °C	Eutektische Temperatur im Gemisch mit Dicyandiamid °C
Coffein	80	Nadeln, Prismen und Körner, später straßenpflasterartiges Aussehen	236	173
Dicodid	95	Tröpfchen, Nadeln, Prismen, Körner	198—199 (II 170)	179 (II 160)
Eukodal	115	Nadeln, Prismen	218—219	189
Theophyllin . . .	130	verschieden geformte Blättchen	274	182
Theobromin . . .	135	Körner, Nadeln	—	197
Narkotin	140	Körner, Nadeln	174	167

so gibt sich dies, da jetzt ein ternäres Gemisch vorliegt, durch einen tieferen Schmelzbeginn zu erkennen. Steht die Alkaloidbase als Vergleichsprüfung nicht zur Verfügung, so wird sie, wie oben bei der Mischschmelzpunktbestimmung beschrieben, durch Sublimation an einen Objektträger erhalten.

Das Morphin konnten wir durch Mikrosublimation aus Leichenteilen bisher nicht in krystallinem Zustand erhalten und durch die Mikromethoden kennzeichnen. Die üblichen Farbreaktionen fielen bei den nach dem Trichloressigsäureverfahren erhaltenen Auszügen jedoch einwandfrei aus. Dasselbe gilt für Äthylmorphin und Papaverin.

Einige leicht flüchtige Alkaloide wie Arecolin, Nicotin, Spartein, Pervitin und Benzedrin lassen sich durch ein von R. OPFER-SCHAUM⁹ angegebenes Mikrodestillationsverfahren nachweisen. Die Lösung des Alkaloids in Äther wird eingeengt und mittels einer Capillare auf einen Objektträger getropft, der über dem Metallring auf dem 30—40° warmen Heiztisch des Mikroschmelzpunktapparates liegt. Noch bevor der letzte Äther tropfen ganz verdunstet ist, nimmt man den Objektträger ab, umgibt sofort den Abdampfrückstand mit einem Glasring von etwa 5 mm Höhe und legt über diesen einen Objektträger mit dem nach unten hängenden Reagenztröpfchen. (Als Reagens dient Styphninsäure (2,4,6-Trinitroresorcin), von dem in einem flachen Wassertröpfchen von höchstens 5 mm Durchmesser mit einem dünnen Glasstab so viel verrieben wird, daß einige ungelöste Kräckelchen verbleiben.) Nach Abkühlen des Heiztisches auf Raumtemperatur bringt man das Präparat auf den Mikroschmelzpunktapparat. Es läßt sich so die Bildung der Styphnatkrystalle im Reagenztröpfchen mikroskopisch verfolgen, wobei im Bedarfsefalle etwas erwärmt werden kann. Wenn sich genügend Styphnatkrystalle gebildet haben, nimmt man den Objektträger ab und verreibt die Krystalle bzw. kratzt mit einem zu einer feinen Spitze ausgezogenen

Glasstab im Reagenstropfen. Dann schiebt man den Krystallbrei mit einem etwa 5 mm breiten und einige Zentimeter langen Streifen gehärteten Filterpapiers zur Mitte des Objektträgers zusammen, wobei man die überstehende Flüssigkeit absaugt und den vollgesogenen Teil des Streifens jeweils abschneidet.

Die Krystalle werden nun auf dem 80—100° warmen Heiztisch kurz getrocknet und mit der Lanzettnadel zusammengekratzt. Dann legt man ein Deckglas auf, vermischt unter leichtem Aufdrücken durch Hin- und Herschieben des Deckglases und bestimmt die eutektische Temperatur, das ist den Schmelzbeginn des Gemisches aus nicht umgewandeltem Reagens und gebildetem Alkaloidstyphnat.

Dieser Nachweis lässt sich noch durch eine Mischprobe mit einem im Hängetropfen aus dem Vergleichsalkaloid gewonnenen Styphnat-Styphninsäuregemisch sichern. Coniin gibt im Styphninsäurehängetrophen keine Krystallbildung. Tabelle 2 zeigt die kennzeichnenden Daten für die Styphnate einer Reihe untersuchter Substanzen.

Tabelle 2.

Substanz	Eutektische Temperatur des Gemisches Styphnat-Styphninsäure in °C	Er-fassungs-grenze in γ	Bemerkungen
Arecolin	121	—	Krystallisiert schlecht, Hauptmasse Tröpfchen. Kratzen im Reagenstropfen führt zur Krystallbildung
Coniin	—	—	Keine Fällung
Nicotin	128	5	Zunächst amorph bzw. tröpfchenförmig. Nach kurzer Zeit aus gelblichen Nadeln bestehende strahlige Büschel. Einige Minuten über dem Untersuchungsmaterial belassen Fällung amorph
Spartein	111	10	
β-Phenylisopropyl-methylamin (Pervitin)	108	30	Zunächst gelbe Tröpfchen, dann Blättchen, Spieße, Stengel. Bei schwächeren Konzentrationen oft nur Tröpfchen, die aber nach Kratzen krystallisieren
β-Phenylisopropylamin (Benzedrin)	121	25	Gelbe Stengel und Nadeln.

Die Brauchbarkeit dieser Methoden prüften wir in Tierversuchen an Meerschweinchen nach. Es gelang uns, aus den Organen die Stoffe auf oben beschriebene Weise zu isolieren und durch die Mikromethoden

einwandfrei zu kennzeichnen. Die Kennzeichnung wird bei einiger Übung außerordentlich erleichtert durch die mikroskopische Beobachtung des Sublimationsvorganges. Die nachfolgenden Abbildungen stellen Mikrosublimate dar, wie wir sie bei unseren Versuchen beobachten konnten. Die beiden ersten Bilder zeigen den Sublimationsvorgang beim Coffein. Abb. 1 zeigt bei etwa 100° zur Beobachtung kommende

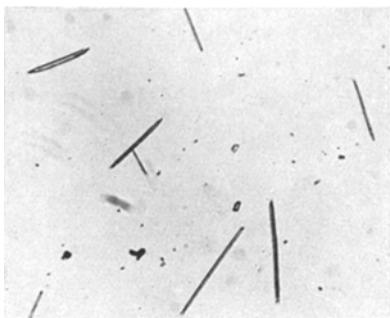


Abb. 1. Coffein bei $\sim 100^{\circ}$.

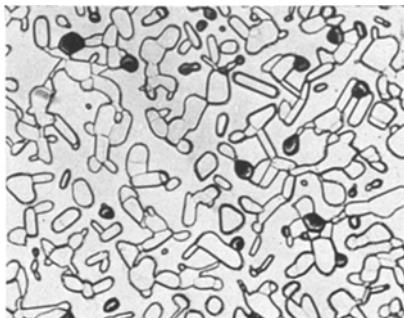


Abb. 2. Coffein bei $\sim 200^{\circ}$.

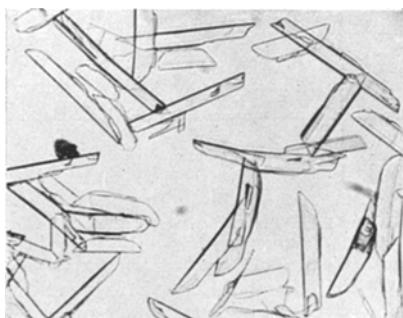


Abb. 3. Theophyllin vor Erreichung des Schmelzpunktes.

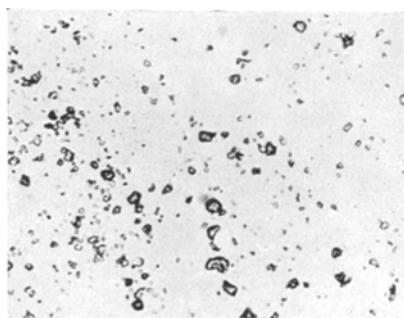


Abb. 4. Theobromin vor Erreichung des Schmelzpunktes.

Nadeln, die bei etwa 200° ein pflasterartiges Aussehen gewonnen haben (Abb. 2). Die Abb. 3 und 4 sind Aufnahmen des Theophyllins bzw. Theobromins kurz vor Erreichung des Schmelzpunktes.

Zusammenfassung.

Alkaloide lassen sich aus toxikologischem Untersuchungsmaterial schneller und einfacher als nach dem Verfahren von STAS OTTO durch Fällung der Eiweißstoffe mit Trichloressigsäure und nachfolgendem Ausschütteln mit organischen Lösungsmitteln isolieren. Die sichere Identifizierung der Alkaloide erfolgt mittels Mikrosublimation und Schmelzpunktbestimmung. Einige leicht flüchtige Alkaloide wie Nicotin usw.

werden durch ein von R. OPFER-SCHAUM angegebenes Mikrodestillationsverfahren nachgewiesen. In vielen Fällen können so die nicht eindeutigen Farbreaktionen ersetzt werden. Tierexperimentelle Untersuchungen zeigten die praktische Brauchbarkeit der Methodik.

Literatur.

- ¹ GOLDBACH, H.-J.: Dtsch. Z. gerichtl. Med. **40**, 368 (1951). — ² FLORENCE, G.: Bull. Soc. chim. France **41**, 1079 (1927). — ³ FLORENCE, G.: Bull. Soc. chim. France **41**, 1242 (1927). — ⁴ OPFER-SCHAUM, R.: Pharmazie **2**, 540 (1947). — ⁵ OPFER-SCHAUM, R.: Pharmaz. Ztg (im Druck). — ⁶ KOFLER, L. u. A.: Mikromethoden zur Kennzeichnung organischer Stoffe und Stoffgemische. Innsbruck 1948. — ⁷ OPFER-SCHAUM, R.: Arch. Pharmaz. **281**, 316 (1943). — ⁸ OPFER-SCHAUM, R.: Vortr. Pharmazeut. Ges. Hamburg 1949. — ⁹ OPFER-SCHAUM, R.: Mikrochem. **31**, 324 (1944).

Dozent Dr. med. H.-J. GOLDBACH, (16) Marburg (Lahn),
Institut für gerichtliche und soziale Medizin der Universität.