

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.

### III. Mitteilung.

#### Flüchtige und mit Wasserdampf flüchtige Gifte.

Von

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

Nachdem in den beiden ersten Mitteilungen<sup>1,2</sup> über Mikroverfahren zum Nachweis von Barbitalen, Analgetica, Sedativa und Alkaloiden berichtet wurde, beschreiben wir im folgenden Mikromethoden zum Nachweis flüchtiger und mit Wasserdampf flüchtiger Gifte, die sich sowohl im Tierexperiment als auch in der Praxis bewährten.

Die Destillation und eventuell notwendige Fraktionierung des Destillates sowie die Wasserdampfdestillation des angesäuerten Untersuchungsmaterials kann unter Verwendung der üblichen Apparaturen erfolgen. Für die Wasserdampfdestillation von kleineren Mengen Organateilen benutzten wir mit Vorteil eine von SCHWANER<sup>3</sup> modifizierte Apparatur nach POZZI-ESCOTT, die leicht von jedem Glasbläser herzustellen ist. Durch auswechselbare Bechereinsätze ermöglicht sie bei Reihenuntersuchungen eine rasche und rationelle Arbeitsweise.

*Methylalkohol* lässt sich wesentlich sicherer als durch die üblichen, oft nicht leicht zu beurteilenden Farbreaktionen durch ein von R. OPFER-SCHAUM<sup>4</sup> vereinfachtes Verfahren der Darstellung und Kennzeichnung des p-Brombenzoësäureesters nach AUTENRIETH<sup>5</sup> nachweisen. Diese Methodik hat sich bei uns (GOLDBACH und OPFER-SCHAUM<sup>6</sup>) ganz besonders in der täglichen Laboratoriumspraxis bewährt.

Man destilliert den angesäuerten Organbrei in üblicher Weise. Bei geringem Gehalt des Untersuchungsmaterials an Methylalkohol wird dieser noch durch fraktionierte Destillation angereichert.

Darstellung des p-Brombenzoësäuremethylesters: 10—40 cm<sup>3</sup> Destillat werden in einer Glasstöpselflasche mit 10—15 cm<sup>3</sup> 10%iger Natronlauge im Wasserbad auf 40—50° C erwärmt, je nach dem vermuteten Methylalkoholgehalt mit 1—5 g fein zerriebenem p-Brombenzoylchlorid (Fa. Schuchardt, München) versetzt — es ist etwa das Dreifache der Theorie erforderlich — und bis zum Erkalten geschüttelt. Die Reaktion muß überprüft und stets alkalisch gehalten werden. Ist p-Brombenzoësäuremethylester entstanden, so tritt ein anisartiger Geruch auf.

Der Ester wird mit Äther ausgeschüttelt. Die ätherische Lösung wäscht man gründlich mit Wasser (anhaftendes Alkali führt sonst bei der Aufbewahrung des Esters zur teilweisen Verseifung), trocknet mit Natriumsulfat und dunstet im Vakuumexsiccator ein.

Die Reindarstellung des Esters erfolgt schneller als durch Umkristallisieren mittels der Absaugmethode von L. KOFLER und R. WANENMACHER<sup>7</sup>.

Man legt auf einen Objektträger ein quadratisches Blättchen gehärtetes Filtrierpapier (Schleicher & Schüll Nr. 575) und breitet darauf in dünner Schicht den Verdunstungsrückstand der Ätherlösung aus. Diesen Objektträger bringt man auf den Heiztisch des Apparates zur Schmelzpunkt-Mikrobestimmung von R. OPFER-SCHAUM<sup>8</sup>, legt quer darüber einen zweiten Objektträger und heizt langsam an. Mit einer unten umgebogenen Pinzette drückt man dabei den oberen Objektträger fest gegen den unteren. Die im Zuge des Erwärmens schmelzenden eutektischen Gemische aus Verunreinigungen und zu reinigender Substanz werden vom Filtrierpapier aufgesaugt, die ungeschmolzenen Anteile bleiben am oberen Objektträger haften. Durch mehrmaliges Wechseln des Filtrerpapiers und Erhitzen bis etwa 78° C erhält man in wenigen Minuten den reinen Ester.

Dieser wird durch eine Schmelzpunkt-Mikrobestimmung gekennzeichnet. Mikro-Schmelzpunkt = 78—80° C. Ab 50° C treten am Deckglas Sublimate in Form von Nadeln, teils an den Enden zugespitzten Prismen und Tröpfchen auf.

Eine weitere Charakterisierung des p-Brombenzoësäuremethylesters kann durch Bestimmung der eutektischen Temperatur mit einer Testsubstanz nach L. und A. KOFLER<sup>9</sup> erfolgen. Der Ester beginnt im Gemisch mit Azobenzol bei 46° C zu schmelzen. Schließlich kann man noch eine mikroskopische Mischschmelzpunktbestimmung mit dem aus reinem Methanol dargestellten Ester vornehmen.

Dieses Verfahren hat sich auch zum Nachweis des Methylalkohols neben Äthylalkohol sehr gut bewährt. Der Nachweis von Methylalkohol in höherprozentigem Äthylalkohol, z. B. in Trinkbranntweinen und Likören, erfolgt, indem man das bei der Bestimmung des Alkoholgehaltes anfallende Destillat, das eventuell vorher noch einmal fraktioniert wird, mit Wasser auf 10—40 cm<sup>3</sup> verdünnt und, wie oben beschrieben, den Ester darstellt.

Zum Nachweis flüchtiger *Aldehyde* und *Ketone* verwenden wir das von R. OPFER-SCHAUM<sup>9</sup> bezüglich der sichereren Identifizierung der erhaltenen Derivate verbesserte „Mikrobecherverfahren“ von C. GRIEBEL und F. WEISS<sup>10,11</sup>.

Die Reagenslösung wird dabei als „Hängetropfen“ an einem Objektträger über das in einem „Mikrobecher“ befindliche Untersuchungsmaterial gebracht. Die nachzuweisenden Aldehyde und Ketone sollen nach GRIEBEL und WEISS an Kristallform und Farbe der mit mehreren Reagenzien (Semicarbazid, o-, m-, p-Nitrophenylhydrazin, m- und p-Nitrobenzhydrazid) gebildeten Verbindungen erkannt werden.

R. FISCHER<sup>12</sup> bestimmte die Mikro-Schmelzpunkte der Reaktionsprodukte. Da, wie FISCHER an Mikrophotographien von Derivaten des p-Nitrophenylhydrazins zeigt, die mit verschiedenen Aldehyden bzw. Ketonen erhaltenen Kristalle oft weitgehende Ähnlichkeiten besitzen, erscheint diese Sicherung des Nachweises durch eine physikalische Konstante unbedingt notwendig. FISCHER reinigt die gebildeten Kristalle vor der Schmelzpunkt-Mikrobestimmung durch Waschen mit Wasser zwischen Objektträger und Deckglas. Man gelangt auf einfachste Weise zu einem wirklich schmelzpunktreinen Derivat, wenn man sich zur Entfernung des anhaftenden Reagens der von L. KOFLER und R. WANNENMACHER<sup>7</sup> angegebenen Methode zum „Trennen und Reinigen organischer Substanzen durch Absaugen der eutektischen Schmelze“ bedient. Die Schmelztemperaturen der so gereinigten p-Nitrophenylhydrazone einiger analytisch wichtiger Aldehyde und Ketone lagen in den meisten Fällen einige Grade höher als die von FISCHER und anderen Autoren angegebenen. Zur weiteren Sicherung des Nachweises bestimmt man die eutektische Temperatur, das ist den Schmelzbeginn einer Mischung des gebildeten Hydrazons mit einer Testsubstanz.

#### *Arbeitsvorschrift.*

Das Untersuchungsmaterial kommt in einen „Mikrobecher“, das ist ein Glasbecherchen von etwa 10—25 mm Höhe und 10—15 mm Weite mit plangeschliffenem Rand. Über den Becher legt man einen Objektträger (Hälfte des üblichen Formats) mit dem Reagenstropfen (p-Nitrophenylhydrazin, gesättigt in 15%iger Essigsäure; jeweils frisch herzustellen und zu filtrieren). Dann bringt man den Becher auf den Mikro-Schmelzpunktbestimmungsapparat von R. OFFER-SCHAUM und beobachtet die Hydazonbildung im Hängetropfen. Bei schweren flüchtigen Aldehyden (z.B. Formaldehyd) wird zur Beschleunigung der Kristallbildung schwach angeheizt.

Sobald sich genügend Hydazonkristalle gebildet haben, nimmt man den Objektträger ab und legt ihn über einen zweiten Objektträger, auf dem sich ein Blättchen gehärtetes Filtrerpapier (Schleicher & Schüll Nr. 575) von etwa 18×18 mm Größe befindet. Die überschüssige Reagenslösung wird vom Filtrerpapier aufgesaugt. Durch festes Andrücken des oberen Objektträgers mit einer unten umgebogenen Flachpinzette erreicht man, daß die Hauptmasse der Hydazonkristalle an diesem haften bleibt. Man hebt ihn ab und legt ihn über einen Objektträger mit einem frischen Filtrerpapierblättchen auf den Heiztisch des Schmelzpunktbestimmungsapparates. Dann wird erwärmt, wobei man den oberen Objektträger immer wieder fest gegen das Filtrerpapier drückt. Es wird das mit dem Ansteigen der Temperatur schmelzende eutektische Gemisch von Hydazon und Reagensresten vom Filtrerpapier

aufgenommen und so das Hydrazon schließlich in völlig reinem Zustand erhalten. Ein nochmaliger Wechsel des Filterpapierblättchens ist meist nicht notwendig; es genügt, die Lage des oberen Objektträgers mit den Kristallen im Laufe des Erhitzens einige Male zu verändern. Einige Grade unterhalb der zu erwartenden Schmelztemperatur wird der Objektträger mit den Kristallen abgenommen.

Einige Kriställchen kratzt man mit der Lanzettnadel ab und bringt sie auf einen Objektträger mit einigen Körnchen Phenacetin. Man legt ein Deckglas auf, vermischt durch Hin- und Herschieben desselben und bestimmt die eutektische Temperatur, das ist den Schmelzbeginn der Mischung.

Mit dem Rest der Kristalle nimmt man eine Schmelzpunkt-Mikrobestimmung und eventuell noch eine Mischschmelzpunktbestimmung vor.

Tabelle 1.

Aldehyd bzw. Keton	Eutektische Tem- peratur des p-Nitrophenyl- hydrazons im Gemisch mit Phenacetin	Schmelzpunkt des p-Nitrophenyl- hydrazon
	°C	°C
Acetaldehyd . . . . .	98	129
Aceton . . . . .	110	149
Acrolein . . . . .	117	160
Formaldehyd . . . . .	116	184
Benzolddehyd . . . . .	120	195

Feste organische Gifte, die aus saurer Lösung mit Wasserdampf flüchtig sind, lassen sich in einfacher Weise durch Schmelzpunkt-Mikrobestimmung und Bestimmung der eutektischen Temperatur mit einer Testsubstanz nach KOFLER sicher kennzeichnen. Das Destillat wird mit Äther (peroxyd- und vinylfrei) ausgeschüttelt. Den Ätherauszug trocknet man mit entwässertem Natriumsulfat und engt ihn auf 1—2 cm<sup>3</sup> ein. Der eingeeengte Ätherextrakt wird mittels einer Glascapillare vorsichtig auf einen „Hohlschliffobjektträger“\* getropft, der über einem Kupferring von 10 mm Höhe, 12 mm äußerem und 6 mm innerem Durchmesser auf dem Mikro-Schmelzpunktapparat von R. OPFER-SCHAUM liegt, der auf etwa 50° angeheizt ist. Man erhält so ohne „Kriechen“ des Äthers über den Rand des Hohlschliffes die nachzuweisende Substanz in der Mitte desselben. Zur Mikrosublimation legt man über den Hohlschliff ein Deckglas und erwärmt die Apparatur weiter. Das Erhitzen wird so geregelt, daß die Temperatur im Bereich von 100° um 4° je Minute steigt.

\* Dieser ist zur bequemeren Handhabung auf 40—50 mm Länge und seitlich bis nahe an den Hohlschliff abgeschnitten. Der Schliff ist ~0,7 mm tief.

Nach dem Auftreten der ersten Sublimate liest man die Temperatur ab. Die Temperatur des Sublimationsbeginns, wie wir sie in Spalte 1 der Tabelle 2 angegeben haben, stellt jedoch keine physikalische Konstante wie der Schmelzpunkt dar. Sie ist von verschiedenen Faktoren wie Sublimationsabstand, Korngröße des Sublimationsgutes, Geschwindigkeit des Temperaturanstieges usw. abhängig.

Tabelle 2.

Substanz	Sublimationsbeginn °C	Aussehen der Sublimate	Mikro-Schmelz- punkt °C	Eutektische Temperatur im Gemisch mit Phenacetin °C
Avertin (Tribrom-äthylalkohol) . . .	40	verschieden geformte Blättchen	78—79	50
β-Naphthol . . . .	60	verschieden geformte Blättchen, teils zu Aggregaten vereint	121—122	69
Jodoform . . . .	70	Körner und sechseckige Blättchen	124—125	116
Salicylsäure . . . .	65	Nadeln und Prismen	158—160	91

Wenn wir die Temperatur des Sublimationsbeginns in der Tabelle trotzdem angeführt haben, so deshalb, weil sie bei Benutzung der hier angegebenen Sublimationsordnung als ein erster Anhaltspunkt zur Kennzeichnung der Sublimate dienen kann. Zur Anregung der Kristallisation kann man mit einer Lanzettndl. die zuerst am Deckglas auftretenden Tröpfchen bekratzen. In Spalte 3 der Tabelle 2 haben wir das Aussehen der sich jeweils bildenden Kristalle beschrieben. Die sichere Kennzeichnung der Sublimate erfolgt durch Schmelzpunkt-Mikrobestimmung, Mischschmelzpunktbestimmung und Bestimmung der eutektischen Temperatur mit einer Testsubstanz. Die Technik dieser Bestimmung ist in unseren beiden ersten Mitteilungen<sup>1,2</sup> ausführlich beschrieben.

#### Zusammenfassung.

Im Tierexperiment und in der Praxis bewährte Mikromethoden zum Nachweis flüchtiger und mit Wasserdampf flüchtiger Gifte werden kurz beschrieben. Ganz besonders wird der Vorteil der Darstellung des p-Brombenzoësäureesters für den Nachweis des Methylalkohols hervorgehoben. Für den toxikologischen Nachweis flüchtiger Aldehyde und Ketone bewährte sich ein Mikroverfahren zur schnellen Reindarstellung der p-Nitrophenylhydrazone. Feste organische Gifte, die aus saurer Lösung mit Wasserdampf flüchtig sind, werden durch eine Schmelzpunkt-Mikrobestimmung und Bestimmung der eutektischen Temperatur

mit einer Testsubstanz nach KOFLER gekennzeichnet. Die Bestimmung physikalischer Konstanten ist möglichst den oft weniger sicheren Farbreaktionen in der Giftnanalyse vorzuziehen.

#### Literatur.

- <sup>1</sup> GOLDBACH, H.-J.: Dtsch. Z. gerichtl. Med. **40**, 368 (1951). — <sup>2</sup> GOLDBACH, H.-J., u. R. OPPFER-SCHAUM: Dtsch. Z. gerichtl. Med. **40**, 433 (1951). — <sup>3</sup> SCHWANER, H.-L.: Dtsch. Apotheker-Ztg **91**, 291 (1951). — <sup>4</sup> OPPFER-SCHAUM, R.: Dtsch. Apotheker-Ztg **57**, 277 (1942). — <sup>5</sup> AUTENREITH, W.: Dtsch. Pharmazie **25**, 1 (1920). — <sup>6</sup> GOLDBACH, H.-J., u. R. OPPFER-SCHAUM: Z. Lebensmittelunters. u. Forsch. **91**, 179 (1950). — <sup>7</sup> KOFLER, L., u. R. WANNENMACHER: Ber. dtsch. chem. Ges. **73**, 1388 (1940). — <sup>8</sup> OPPFER-SCHAUM, R.: Süddtsch. Apotheker-Ztg **89**, 269 (1949). — <sup>9</sup> KOFLER, L. u. A.: Mikromethoden zur Kennzeichnung organischer Stoffe und Stoffgemische. Innsbruck: Wagner G.m.b.H. 1948. — OPPFER-SCHAUM, R.: Angew. Chem. **62**, 144 (1950). — <sup>10</sup> GRIEBEL, C.: Mikrochem. **5**, 146 (1927). — <sup>11</sup> GRIEBEL, C., u. F. WEISS: Z. Unters. Nahr.- u. Genußm. **47**, 438 (1924). — <sup>12</sup> FISCHER, R.: Mikrochem. **19**, 123 (1933).

Dozent Dr. H.-J. GOLDBACH, Marburg a. d. Lahn,  
Institut für gerichtliche und soziale Medizin der Universität.