

(Aus dem Pharmakognostischen Institut der Universität Innsbruck.)

Mikroskopische Methoden zum Nachweis von Giften.

Von

Prof. Dr. Ludwig Kofler, Innsbruck.

Mit 8 Textabbildungen.

Bei der toxikologischen Analyse läßt sich häufig aus Mangel an Substanz der Schmelzpunkt nach dem üblichen Verfahren nicht ermitteln. Unter dem Mikroskop dagegen läßt sich die Schmelzpunktbestimmung noch mit geringsten Substanzmengen durchführen; unter Umständen genügt $\frac{1}{1000000}$ g. Ein hiezu geeigneter Apparat besteht aus einer elektrisch geheizten Metallplatte, die auf den Objektstisch eines beliebigen Mikroskopes aufgesetzt wird. Gegen die umgebende Luft ist der Apparat durch einen an der Peripherie der Heizplatte aufgesetzten Metallring, auf den eine Glasplatte aufgelegt wird, geschützt. In einer seitlich angebrachten Bohrung der Heizplatte steckt ein Thermometer, das mit Hilfe scharf schmelzender Substanzen geeicht wurde. Die Substanz, deren Schmelzpunkt bestimmt werden soll, liegt zwischen Objektträger und Deckglas auf der Heizplatte des Apparates und wird bei 80—100-facher Vergrößerung in durchfallendem Licht beobachtet.

Der Schmelzpunkt läßt sich unter dem Mikroskop auf zweierlei Art bestimmen. Bei der „durchgehenden“ Arbeitsweise läßt man die Temperatur des Heiztisches bis zum vollständigen Schmelzen der Substanz ohne Unterbrechung ansteigen und beobachtet die einzelnen Kryställchen, bis sie geschmolzen sind (Abb. 1—4). Bei der Schmelzpunktbestimmung mit Hilfe des „Gleichgewichtes“ stellt man die Heizung des Apparates ab, bevor die Substanz ganz geschmolzen ist. Die in den größeren Schmelztropfen noch vorhandenen Krystallreste beginnen dann beim Sinken der Temperatur zu wachsen. Nun wird wieder angeheizt, bis die Krystallreste neuerlich zu schmelzen anfangen (Abb. 5—8). Durch beliebiges Wiederholen dieses Spieles kann man bei vielen unzersetzt schmelzenden Stoffen das Gleichgewicht zwischen fester und flüssiger Phase einstellen und dadurch den Schmelzpunkt ganz genau bestimmen.

Durch die Schmelzpunktmikrobestimmung erfährt man aber nicht nur den Schmelzpunkt einer Substanz, sondern gleichzeitig noch mancherlei andere kennzeichnende Eigenschaften. Denn unter dem Mikroskop kann man das Verhalten jedes einzelnen Kryställchens oder Partikelchens vor,

beim und nach dem Schmelzen verfolgen. Bei zahlreichen organischen Stoffen wurde auf diese Weise eine Fülle von Eigenschaften festgestellt, die bisher der Beobachtung entgangen waren.

Nur wenige Stoffe bleiben *vor* dem Schmelzen ganz unverändert. Bei den meisten sieht man während des Erhitzens mannigfache durch *Sublimationsvorgänge* bedingte Veränderungen. Viele Substanzen lagern

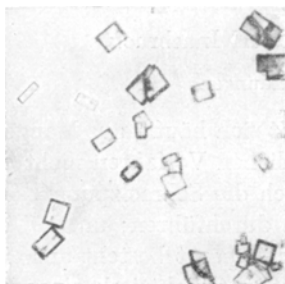


Abb. 1. Bei 89°.

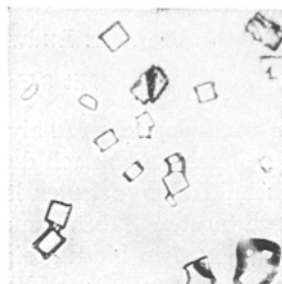


Abb. 2. Bei 90°.

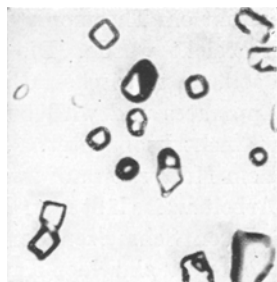


Abb. 3. Bei 90,5°.

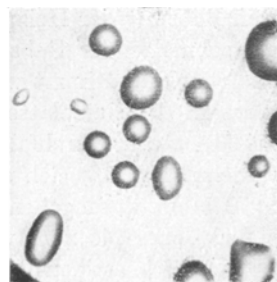


Abb. 4. Bei 91°.

Abb. 1—4. Schmelzen von Anästhesin unter dem Mikroskop. Durchgehende Bestimmung.

sich unter unseren Augen so weitgehend um, daß sie kurz vor dem Schmelzen ein völlig anderes Aussehen gewinnen, als sie zu Beginn des Versuches hatten. Sehr häufig sublimieren die Substanzen teilweise oder ganz vom Objektträger an die Unterseite des Deckglases. Für viele Substanzen sind Form und Aussehen dieser oft zu prächtigen Krystallen ausgebildeten Sublimate kennzeichnend und für die Identifizierung wertvoll. Die Temperatur, bei der die Sublimation unter Voraussetzung bestimmter Versuchsbedingungen erfolgt, ist ebenfalls für viele Substanzen kennzeichnend. Die Sublimation auf dem Heiztisch unter fortlaufender mikroskopischer Kontrolle läßt sich

beim Giftnachweis häufig mit Vorteil heranziehen zur Reinigung der Substanz und ihrer Vorbereitung für die Schmelzpunktmikrobestimmung.

Bei *lösungsmittelhaltigen* Substanzen beobachtet man häufig das Entweichen der Krystallflüssigkeit, das sich dadurch verrät, daß die vorher klaren Krystalle trüb und undurchsichtig werden. Oft schmelzen aber lösungsmittelhaltige Krystalle schon vor dem Entweichen der Flüssigkeit; bei weiterem Erhitzen verdampft die Flüssigkeit, worauf die Schmelztropfen nicht selten zu flüssigkeitsfreien Krystallen erstarren, die dann beim Erreichen des Schmelzpunktes der lösungsmittelfreien Substanz schmelzen. Durch die mikroskopische Schmelz-

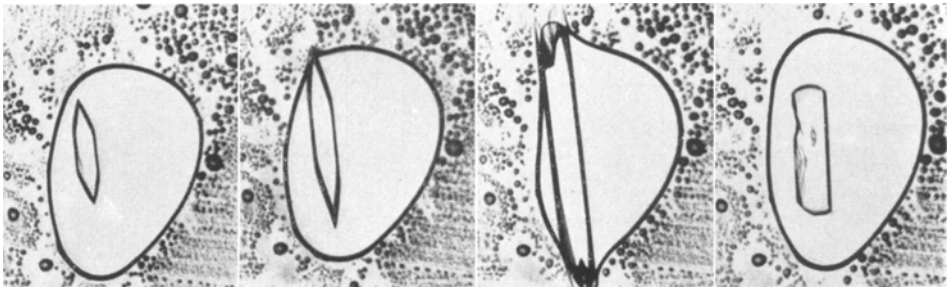


Abb. 5.

Abb. 6.

Abb. 7.

Abb. 8.

Abb. 5–8. o – Nitrophenol; Schmelzpunktbestimmung im „Gleichgewicht“.

punktbestimmung konnten viele Literaturangaben über lösungsmittelhaltige Krystalle richtiggestellt werden.

Nach dem vollständigen Schmelzen erstarren manche Stoffe rasch, andere erst nach längerer Zeit und bei Temperaturen weit unter dem Schmelzpunkt oder nach Anwendung von verschiedenen Kunstgriffen. Die meisten Substanzen erstarren aus ihren Schmelzen krystallin, einzelne glasig. Die krystallin erstarrten Schmelzen zeigen entweder regellose Krystallgefüge oder häufiger Gebilde von ganz bestimmter Anordnung.

Im Anschluß an die Schmelzpunktbestimmung läßt sich unter dem Mikroskop auch die *Lichtbrechung* der Schmelze bestimmen. Zu diesem Zwecke versetzt man das mikroskopische Präparat mit ein paar Stäubchen eines Glaspulvers von bekannter Lichtbrechung, schmilzt und vergleicht die Lichtbrechung der Schmelze mit der der Glassplitter. Bei Gleichheit der Lichtbrechung sind die Glassplitter in der Schmelze unsichtbar, bei Ungleichheit sind sie sichtbar, und zwar um so deutlicher, je größer der Unterschied in der Lichtbrechung zwischen den Glassplittern und der Schmelze ist. Ob die Glassplitter höher oder

niedriger brechend sind als die Schmelze, erkennt man an der sog. *Beckeschen* Linie, das ist die helle Linie, die die Glassplitter umsäumt. Je nachdem ob die Glassplitter höher oder niedriger brechend sind als die Schmelze, verhält sich die *Beckesche* Linie beim Bewegen des Mikroskoptubus verschieden; beim Heben des Tubus wandert die helle Linie gegen das höher brechende Medium.

Für diese Bestimmungen steht eine Skala von 23 Glaspulvern mit verschiedenen Brechungsexponenten zur Verfügung. Nach dem bisher Gesagten könnte man zwei Pulver der Skala suchen, zwischen denen die Lichtbrechung der zu untersuchenden Schmelze liegt. In Wirklichkeit kann man jedoch den Brechungsexponenten der Schmelze viel genauer ermitteln. Dies beruht auf der bekannten Tatsache, daß der Brechungsexponent der Flüssigkeiten mit zunehmender Temperatur abnimmt. Deshalb zeigen sich beispielsweise Schlieren, wenn man heißes Wasser in kaltes einfließen läßt. Die Lichtbrechung der Gläser dagegen bleibt bei Temperatursteigerung praktisch unverändert. Zur genauen Bestimmung wählt man auf Grund der Vorversuche von den beiden Gläsern, deren Index dem der geschmolzenen Substanz am nächsten kommt, das Glas mit dem niedrigeren Index. Unmittelbar nach dem Schmelzen wird dann die Schmelze höher brechend sein als die Glassplitter; bei weiterem Erhitzen nimmt die Lichtbrechung der Schmelze ab, die *Beckesche* Lichtlinie und die Glassplitter werden immer undeutlicher, um schließlich vollständig zu verschwinden. Bei weiterem Temperaturanstieg tauchen die Glassplitter wieder auf, die *Beckesche* Lichtlinie zeigt jedoch das umgekehrte Verhalten wie vorher, die Schmelze ist niedriger brechend geworden. Das Ergebnis wird dann beispielsweise so angegeben: „1,6010 bei 122—124°“, d. h. bei 122° sind die Glassplitter eben noch als niedriger brechend erkennbar, bei 123° sind sie in der Schmelze unsichtbar, und bei 124° tauchen sie als höher brechend wieder auf.

Schmelzpunkt und Brechungsexponent bilden ein ausgezeichnetes Hilfsmittel zum raschen Erkennen organischer Substanzen. Für die praktische Ausnützung haben wir begonnen, Listen zusammenzustellen, die die Schmelzpunkte der Substanzen enthalten und die Temperatur, bei der die Lichtbrechung der Schmelze einem oder zwei bestimmten Gläsern der Skala gleich ist. In der letzten Spalte unserer Tabellen sind die „Besondere Kennzeichen“ der einzelnen Substanzen angegeben, die während der Schmelzpunktbestimmung vor, beim und nach dem Schmelzen zu beobachten sind. Nachstehend findet sich ein kleiner Ausschnitt aus diesen Tabellen.

Zur Identifizierung einer Substanz wird zunächst der Schmelzpunkt bestimmt. Auf Grund der Höhe des Schmelzpunktes kommen dann meist mehrere Substanzen in die engere Wahl. Nun sucht man unter

den „besonderen Kennzeichen“, auf welche Substanz die bei der Schmelzpunktbestimmung beobachteten Erscheinungen am besten passen. Zur endgültigen Sicherung der Diagnose wird dann der Brechungsexponent bestimmt. Auf diese Weise ist eine Identifizierung organischer Substanzen durchführbar, wie sie mit gleicher Schnelligkeit und Sicherheit nach keinem bisher bekannten Verfahren möglich war.

Schmelzpunkt (° C)	Substanz	Brechung des Glases	Temperatur ° C	Besondere Kennzeichen
134—135	1,2-Sulfobenzoesäure	1,5301	125—127	Schmilzt krystallwasserhaltig bei 97°, krystallisiert gleich wieder aus in spitzen Krystallen, die bei 134—135° schmelzen.
135	Zimtsäure	1,5609	136	Ab 100° Tröpfchen. Rauten und quadratische Blätter.
135	Phenacetin	1,5101	158—161	Ab 110° Balken, Nadeln, Blättchen. Polymorph.
135	2,6-Dimethylpyron	1,5000	134—135	Ab 110° Balken, Nadeln, Blättchen. Polymorph.
135	2,6-Dimethylpyron	1,4683	156—157	Ab 60° Stengel, Nadeln, kurze Prismen. Gleichgew.: sechseckige Blättchen u. Rauten. Schmelze erstarrt zu verfilzter Krystallmasse.
			146—147	

Für Schlafmittel wurde von *R. Fischer*¹ ein Analysengang zur Isolierung aus Liquor, Blut, Harn usw. und zur Identifizierung auf Grund der Mikromethodik ausgearbeitet. Die Geschwindigkeit unseres Identifizierungsverfahrens wurde bei Vorträgen wiederholt unter Beweis gestellt. Wir ließen uns zu Beginn des Vortrages von unparteiischer Seite Proben übergeben, die während des Vortrages von einer Mitarbeiterin nach dem geschilderten Verfahren identifiziert wurden. Die für eine Probe benötigte Zeit betrug im Durchschnitt 20 Minuten. Dabei stand außer dem Mikroschmelzpunktapparat, der Glaspulverskala und unseren Schmelzpunkttabellen kein anderes Hilfsmittel zur Verfügung. Die Tabellen umfaßten damals 326 Stoffe. Aus diesen Substanzen waren die Proben ausgewählt. Wenn die Listen, an deren Erweiterung wir arbeiten, an Umfang zunehmen, so wird naturgemäß die Identifizierung einer einzelnen Substanz unter der größeren Zahl mehr Zeit beanspruchen. Je umfangreicher aber unsere Schmelzpunkttabellen werden, um so größer wird der Unterschied in der Zeit sein, die man zur Identifizierung einer Substanz nach unserem und einem der bisher üblichen Analysengänge benötigt.

Eine ausführliche Beschreibung der Arbeitsweise mit einfachen Übungsbeispielen und den erwähnten Tabellen ist soeben als Beiheft

der Angew. Chem. erschienen². Einen guten Einblick in die Schmelzvorgänge unter dem Mikroskop gewährt ein Film, der bei der „Reichsanstalt für Film und Bild in Wissenschaft und Unterricht des Reichserziehungsministeriums“ zur Verfügung steht³.

Literaturverzeichnis.

¹ *Fischer, R.*, Arch. Pharmaz. **277**, 306 (1939). — ² *Kofler, L.*, Angew. Chem. **1940**, Bei-H. Nr 36. — ³ Reichsanstalt für Film und Bild in Wissenschaft und Unterricht des Reichserziehungsministeriums. Hochschulfilm Nr C 303/1939 „Identifizierung organischer Substanzen durch die Mikroschmelzpunktbestimmung“ von *L. Kofler* u. *E. Lindpaintner*.
