

Die Aufklärung und chemische Identifizierung eines herzkraft- und frequenzsteigernden Stoffes aus Extrakten von menschlichen Nieren

J. Paraškevo¹, W. Ried¹ und N. Rietbrock²

¹Institut für Organische Chemie und ²Abteilung für Klinische Pharmakologie
der J.-W.-Goethe-Universität, D-6000 Frankfurt/Main, Bundesrepublik Deutschland

Elucidation and Chemical Identification of Cardioactive Compounds from Extracts of Human Kidneys

Summary. Bioassays involving the measurement of cardioactivity have been used in the past to determine glycoside concentration in post-mortem specimens following glycoside poisoning. This paper describes the presence of a cardioactive principle in alcoholic extracts of kidney that could interfere with these bioassays and which has been identified as tyramine.

For the analysis of tyramine a combination of purification methods was employed, including cation exchange with Sephadex CM C-25, gel filtration and HPLC. Detection was achieved using mass spectrometry after careful cation-exchange treatment. The fragmentation pattern with and without prior formation of the TFA-derivative corresponded to that tyramine. IR and UV spectra also indicated the presence of tyramine.

Under suitable experimental conditions, positive inotropic and positive chronotropic effects on the right guinea-pig atrium and positive inotropic effect on the left guinea-pig atrium produced by the kidney extract can be shown to differ from those cardiac glycosides.

These investigations bring into question earlier court decisions made in legal processes which have been based upon the results of bioassays for the evaluation of cardiac glycoside toxicity.

Key words: Bioassays – Cardioactive substances – Glycoside poisoning

Zusammenfassung. Mit Bioassays als postmortalen Nachweisverfahren für Herzglykosidvergiftungen wird versucht, die kardioaktive Wirkung der in Organen enthaltenen Glykosidkonzentration darzustellen. Ein kardioaktiv wirksames Prinzip, das aus alkoholischen Extrakten menschlicher Nieren gefunden wurde, konnte jedoch dem bekannten Tyramin zugeordnet werden.

Der Nachweis gelang nach kombinierter Reinigung mittels Kationenaustausch an Sephadex CM C-25, Gelfiltration und HPLC sowie durch Massenspektroskopie nach besonders vorsichtigem Kationenaustausch. Dabei wurden die Fragmentierungsmuster von Tyramin durch Verdampfung der isolierten, biologisch wirksamen Substanz sowie nach Derivatisierung zum Trifluoroacetylderivat erhalten. IR-Spektren und UV-Daten stimmen ebenfalls mit Tyramin überein.

Die Erfassung der von Herzglykosiden unterscheidbaren pharmakologischen Wirkung erfolgte über den positiv inotropen und positiv chronotropen Effekt am rechten und über den positiv inotropen Effekt am linken Meerschweinchen-Vorhof.

Die Untersuchungen zeigen die zweifelhafte Basis früherer gerichtlicher Entscheidungen, bei denen Bioassays den Nachweis der Herzglykosid-Giftwirkung erbringen sollten.

Schlüsselwörter: Glykosidvergiftung – Bioassay – Herzaktive Substanzen

Im Rahmen eines forensischen Gutachtens untersuchte H. Scholz 1977 [1] alkoholische Gewebsextrakte [2] von Verstorbenen, bei denen der Verdacht auf Digitalis-Überdosierung bestand.

Den bekannten analytischen Verfahren zur Bestimmung von Herzglykosiden liegen unterschiedliche Prinzipien zugrunde. Zu den biologischen kamen später auch physikalisch-chemische und immunologische Verfahren hinzu. Die immunologischen Verfahren haben hohe Empfindlichkeit, allerdings ist eine Störung durch Kreuzreaktivitäten möglich.

TLC-, GC- und HPLC-Verfahren zeichnen sich durch hohe Spezifität aus. Sie sind allerdings weniger empfindlich und erfordern daher entsprechende Vorreinigung der Extrakte. Ein Reinigungsverfahren für Gewebeproben mit einfacher Handhabung wurde erst kürzlich von R. Aderjan publiziert [3].

Bei der Untersuchung auf Glykoside stieß H. Scholz auf ein kardioaktives Prinzip [4]. Mit Hilfe der durchgeführten pharmakodynamischen Untersuchungen an isolierten linken Vorhöfen von Meerschweinchen und Ratten schloß er Herzglykoside, α - und β -Sympathomimetika, indirekt wirkende Sympathomimetika, H(1), H(2)-histaminerge Substanzen, Coffein, Kalziumcanrenoat, Ca^{++} -, K^+ -Salze sowie Harnbestandteile Kreatin, Kreatinin und Harnstoff und schließlich auch Verwesungsprodukte, z. B. die Diamine, Cadaverin und Putrescin als Ursachen der pharmakologischen Aktivität aus [4].

In darauffolgenden Studien wurde der im Vorhofstest beobachtete positiv chronotrope (p.c.) Effekt des Extrakts beschrieben [5, 6], der zu der positiven Inotropie hinzukam [4, 5, 6]. Beide Effekte waren dosisabhängig. Am Meerschweinchen-Ileum verursachte die Extraktapplikation eine nach dem Auswaschen völlig reversible steile Kontraktion [5, 6]. Antagonistenversuche ergaben ein Wirkspektrum, das als histaminähnlich mit muskulotroper Komponente angesehen werden konnte [5, 6]. Früher publizierten Ergebnissen einer Gruppentrennung konnte ebenfalls entnommen werden, daß das Wirkprinzip ein biogenes Amin oder ein nicht allzu großes Peptid sein konnte [5, 6].

Material und Methode

Materialien

Ein Pool alkoholischer Extrakte aus gesunden menschlichen Nieren (Kardioaktivitätsvergleich: Niere > Herz > Leber > Gehirn) (12,5 ml EtOH/1 g Gewebe) wurde 24 h post mortem entnommen und bei 4°C ca. 90 Tage gelagert. Die Extrakte wurden bei 36°C bis zur Trockne eingengt, der feste Rückstand in Wasser aufgenommen (2,5 ml H₂O/1 g Gewebe) und mit Petroläther (PÄ 40°–80°C) gewaschen (5 ml PÄ/1 g Gewebe). Der PÄ und die Lipid-Grenzphase waren pharmakologisch inaktiv. Die H₂O-Phase wurde gefriergetrocknet und erneut in Wasser aufgenommen (6,4 ml H₂O/1 g Trockensubstanz). Nach nochmaligem Zentrifugieren mit hoher Beschleunigung (Sorvall 13 000 $\frac{U}{min}$, 3°C, 50 min) wurde die Hauptphase vom Sediment und der oberen Fettschicht befreit, gefriergetrocknet und erneut in Wasser (5 ml H₂O/1 g Trockensubstanz) aufgenommen. Wegen der bei der großen Verdünnung des Wirkfaktors an der Luft bei Raumtemperatur auftretenden Instabilität wurde der Extrakt bei –20°C portioniert gelagert.

Ausbeute: 28,3 mg gefriergetrocknete Substanz pro 1 g Gewebe \cong 2,83%.

Erscheinungsform: pulveriger Feststoff, dunkel bräunliche Farbe, übler Geruch.

Meßverfahren

a) Pharmakologische Charakterisierung des Wirkfaktors in vitro

Die Kardioaktivität wurde an isolierten rechten und linken Vorhöfen von Meerschweinchen geprüft (Tyrode/Carbogen pH = 7,4, 30°C, Vorlast 1 g, rechter Vorhof freischlagend, linker Vorhof stimuliert mit rechteckigen Doppelimpulsen 1,5 Hz, 0,1 mA, Grundrhythmus 800 ms, Breite 5 ms). Parameter waren Kraft und Frequenz. Die Kraft wurde über die Veränderung der Amplitude oder die absolute Amplitude nach Extraktapplikation im Verhältnis zum unbehandelten Vorhof erfaßt (ΔA (%) oder A (%), linker Vorhof $\Delta A_{l.v.}$ (%) oder $A_{l.v.}$ (%), rechter Vorhof $\Delta A_{r.v.}$ (%) oder $A_{r.v.}$ (%)). Die Frequenzveränderung (ΔF (min⁻¹)) bezog sich auf den freischlagenden Vorhof nach Extraktapplikation. Die statistische Auswertung ermöglichte trotz biologischer Streuung relevante Aussagen.

Wie eine standardisierte Lagerung (1 Jahr, 4°C, geschlossenes Gefäß, 4 Nieren) die Ausbeute am kardiotonen Prinzip beeinflusst, wurde getestet. Jeweils am 2.–3. (\bar{x} = 2,8), 43.–53. (\bar{x} = 45,5), 92.–96. (\bar{x} = 95,0), 131.–133. (\bar{x} = 132,5), 185. (\bar{x} = 185,0), 273. (\bar{x} = 273,0) und 365. (\bar{x} = 365,0) Tag wurden Proben von jeder Niere entnommen, Extrakte hergestellt und die Wirksamkeit bestimmt.

b) In vivo-Versuche am Ganztier

Ganztiereffekte wurden an anästhesierten Meerschweinchen (Fentanyl = 4,01 ml/kg, Fluanisan = 1,60 ml/kg, Valium = 0,50 ml/kg) untersucht. Es wurde der intraarterielle Blutdruck der Arteria carotis und das Elektrokardiogramm nach intravenöser Bolusinjektion (0,9 ml = 35,1 mg Trockensubstanz, Extrakt : physiologische NaCl-Lösung/1 : 51) und eine Dauerinfusion (35,1 mg Trockensubstanz/min) registriert.

c) Chromatographische Trennverfahren

Kationenaustausch. Der Extrakt wurde mit dem Kationenaustauscher Sephadex CM C-25 [7] gereinigt (Extrakt: 500 μ l, Säule 2 \times 7,5 cm, NaCl-Konzentrationsgradient 0–2 M, UV-Registrierung bei 254 nm) und die Wirksamkeit im Vorhofstest (ΔA , ΔF) geprüft.

HPLC. Zur Reinheitsprüfung der Kationenaustauschfraktionen wurde die HPLC-Trennung mit Lichrosorb RP 18, 1 μ m durch Variation der Lösungsmittel nach steigender Polarität optimiert (Gesättigte Kationenaustauschprobe : Elutionsmittel/1 : 1 10 μ l, Knauer 4,6 \times 25 mm, MeOH : H₂O/70 : 30, UV-Registrierung bei 280 nm, 254 nm. Fluoreszenzregistrierung bei 280 nm Einstrahlung, bei 300 Emission).

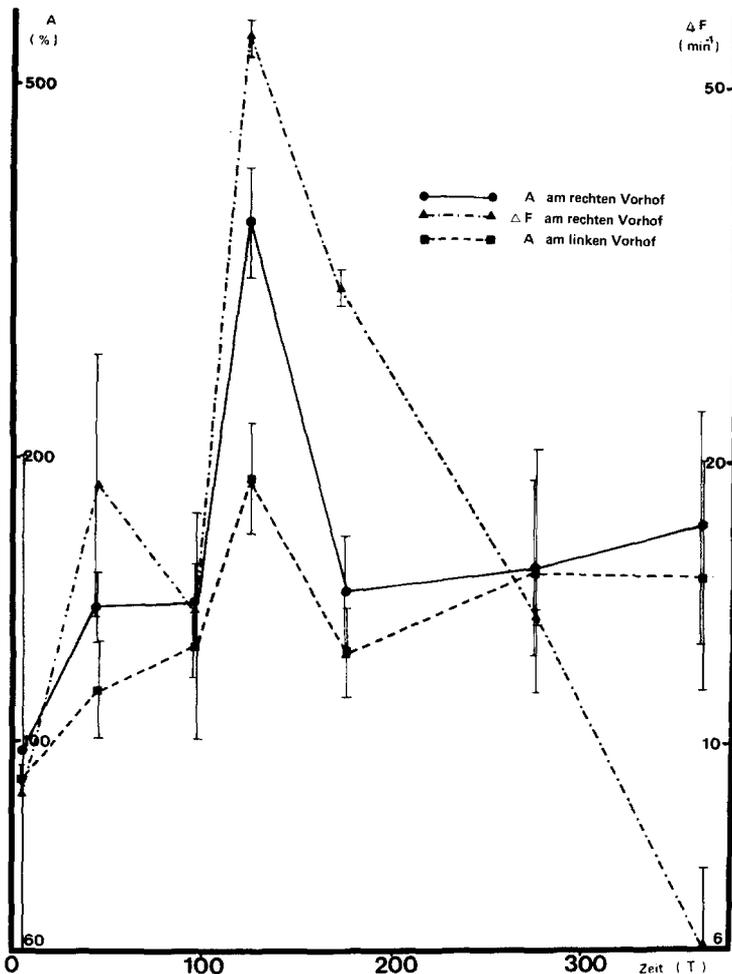


Abb. 1. Entwicklung der mittleren Kraft [A (%)] und Frequenzzunahme [ΔF (min^{-1})] am rechten und linken Vorhof bei $n=4$ Nieren, antilog ($\bar{x} \pm \text{S.D.}$) über 1 Jahr [Zeit (T)] post mortem

Schonender Kationenaustausch. Die oben dargestellte Kationenaustauschchromatographie wurde besonders schnell bei 4°C und unter Ausschluß von UV-Licht durchgeführt. Die Proben wurden sofort gefriergetrocknet und bei -20°C aufbewahrt.

Ergebnisse

Pharmakologische Effekte

Die pharmakologischen Wirkungen von 15 Nieren [positiv inotrop (p.i.), p.c.] wurde durch Gegenüberstellung und Ermittlung der Korrelation der Mittelwerte ($n=5$) der unterschiedlichen Effekte am rechten Vorhof, p.i. (r), p.c. (r) und am linken Vorhof p.i. (l) geprüft. Es ergaben sich signifikante Korrelationskoeffizienten: $r_{\text{p.i.}(r)/\text{p.i.}(l)} = 0,8957$, $V_{\text{p.c.}(r)/\text{p.i.}(l)} = 0,699$.

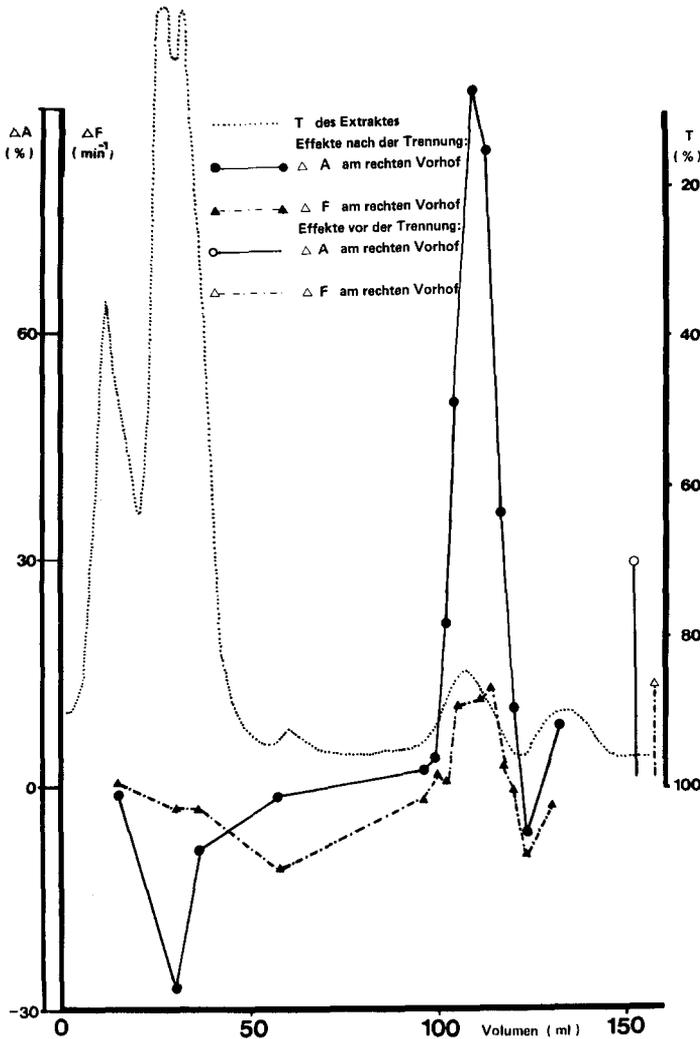


Abb. 2. Verhalten der Kardioaktivität [ΔA (%), ΔF (min^{-1})] in Beziehung zur Transmission [T (%)] im Eluat [Volumen (ml)] bei dem Kationenaustausch des Rohextraktes mit Sephadex CM C-25

Bei der statistischen Auswertung der Kardioaktivitäten von 11 Nieren wurde keine Abhängigkeit der p.i. und p.c. Effekte von den Medikamenten und Diagnosen der Organspender festgestellt.

Beim Ganztierversuch führte eine intravenöse Bolusinjektion für ca. 3 min zu einem vorübergehenden Anstieg des systolischen Blutdruckes und der Herzfrequenz. Der gleiche Effekt konnte durch eine Dauerinfusion über 10 min während der gesamten Infusionszeit aufrechterhalten werden.

Bei der standardisierten Lagerung zeigten die logarithmierten Mittelwerte bis ca. zu 130. Tag einen steilen Anstieg, danach eine Abnahme der Aktivitäten des Extraktes. Dabei verhielten sich alle Werte im wesentlichen parallel (Abb. 1).

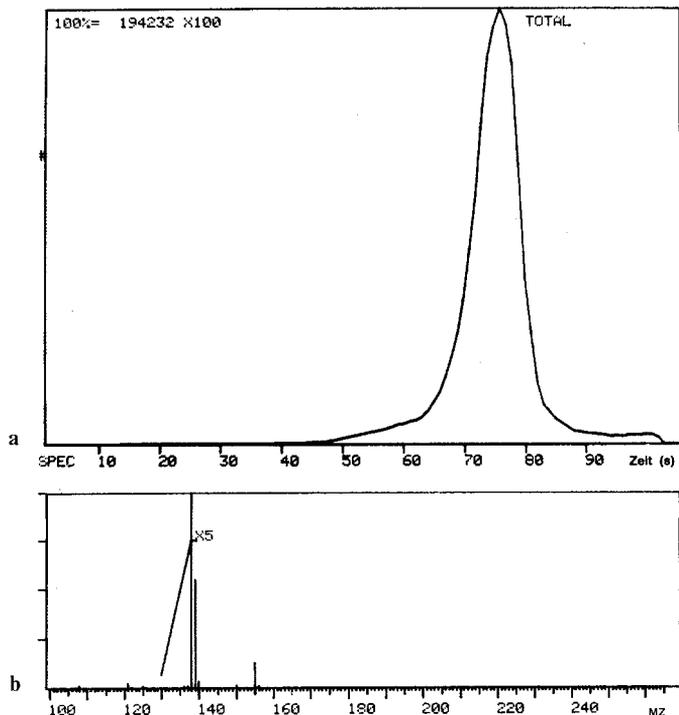


Abb. 3. **a** Verdampfungskurve der massenspektrographisch getrennten Substanz, der totale Ionenfluß (194232×100) als 100% Intensität wurde der Retentionszeit [Zeit (s)] gegenübergestellt. **b** Das zugehörige Massenspektrum des Molpeaks, der totale Ionenfluß (194232×100) als 100% Intensität wurde der Massenzahl (MZ) gegenübergestellt

Darstellung der kardioaktiven Substanz

Der Kationenaustausch des Extraktes mit Sephadex CM C-25 [7] ergab einen effektiven Trennschritt. Das Flächenverhältnis unter der Transmissionskurve wies auf eine weitgehende Reinigung hin (Abb. 2).

Durch HPLC ließ sich eine Aufspaltung in 2 Peaks erzielen, von denen der breitere eine ausgeprägte Schulter aufwies.

Die „Isolierung“ des gesuchten aktiven Faktors gelang massenspektrographisch mit aktiven Proben, die in einem sehr schonenden Kationenaustausch gereinigt worden waren. Durch die anschließende Verdampfung bei der Massenspektrographie wurde der Wirkstoff isoliert. Die Verdampfungskurve zeigte einen scharfen einheitlichen Peak mit der Retentionszeit von 1,31 min. Das zugehörige Massenspektrum wies einen Molpeak mit der Massenzahl 138 auf. Diese Massenzahl entspricht dem Fragment MH^+ , da die Verdampfung im Ammoniak-Strom durchgeführt wurde (Abb. 3). Die Maxima der Ionenflüsse der drei wichtigsten Peaks des Massenspektrums und der totale Ionenfluß traten im gleichen Zeitpunkt auf. Somit konnte das Prinzip als Reinsubstanz identifiziert werden.

Das Massenspektrum der direkt verdampften Substanz zeigte den Molpeak für M^+ bei 137 MZ. Der Basispeak hatte die Massenzahl 108 (Abb. 4).

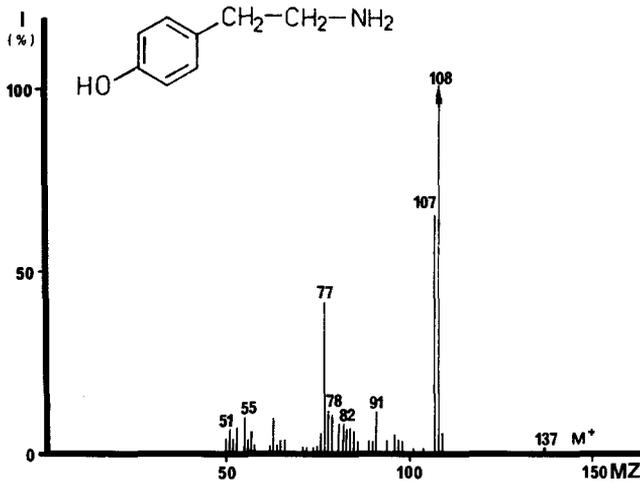


Abb. 4. Zerfallsspektrum des Wirkprinzips, die Intensität [I (%)] wurde gegen die Massenzahl (MZ) aufgetragen, mit der zugehörigen Formel des Tyramins

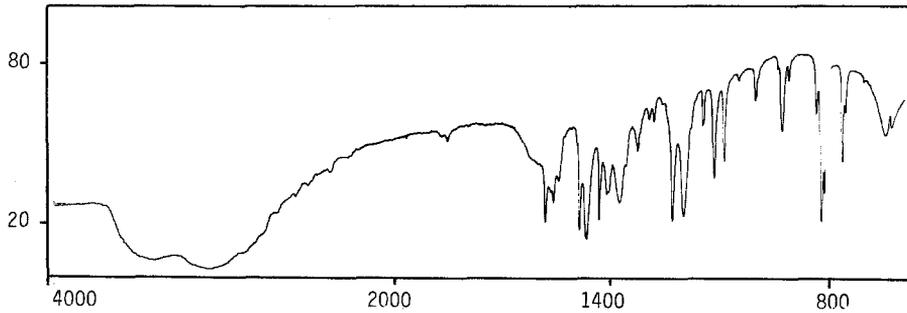


Abb. 5. IR-Spektrum der Wirksubstanz

Für die Aufnahme des IR-Spektrums der gefriergetrockneten wirksamen Kationenaustauschfraktionen wurde der direkte Pressling hergestellt (Abb. 5).

Die UV-Spektren der schonend mit Kationenaustausch getrennten Wirksubstanz mit und ohne FeCl_3 wiesen jeweils 2 Maxima auf (Abb. 6).

Das aus der NaCl -haltigen aktiven Kationenaustausch-Fraktion mit TFAA dargestellte Derivat wurde massenspektrographisch isoliert bei gleichzeitiger Aufnahme des Massenspektrum. Die Massenzahl des Molpeaks betrug 233, die des Basispeaks 51 bzw. 50 (Abb. 7).

Diskussion

Der erste biologische Nachweis einer „Digitalin“-Vergiftung wurde an freigelegten Froschherzen schon im Jahre 1863 im Mordprozeß gegen den Arzt Dr. Conty de la Pommerais durchgeführt [8]. Was damals schon heftig angefochten wurde, entwickelte sich in den ersten Jahrzehnten dieses Jahrhunderts bei Gerichts-

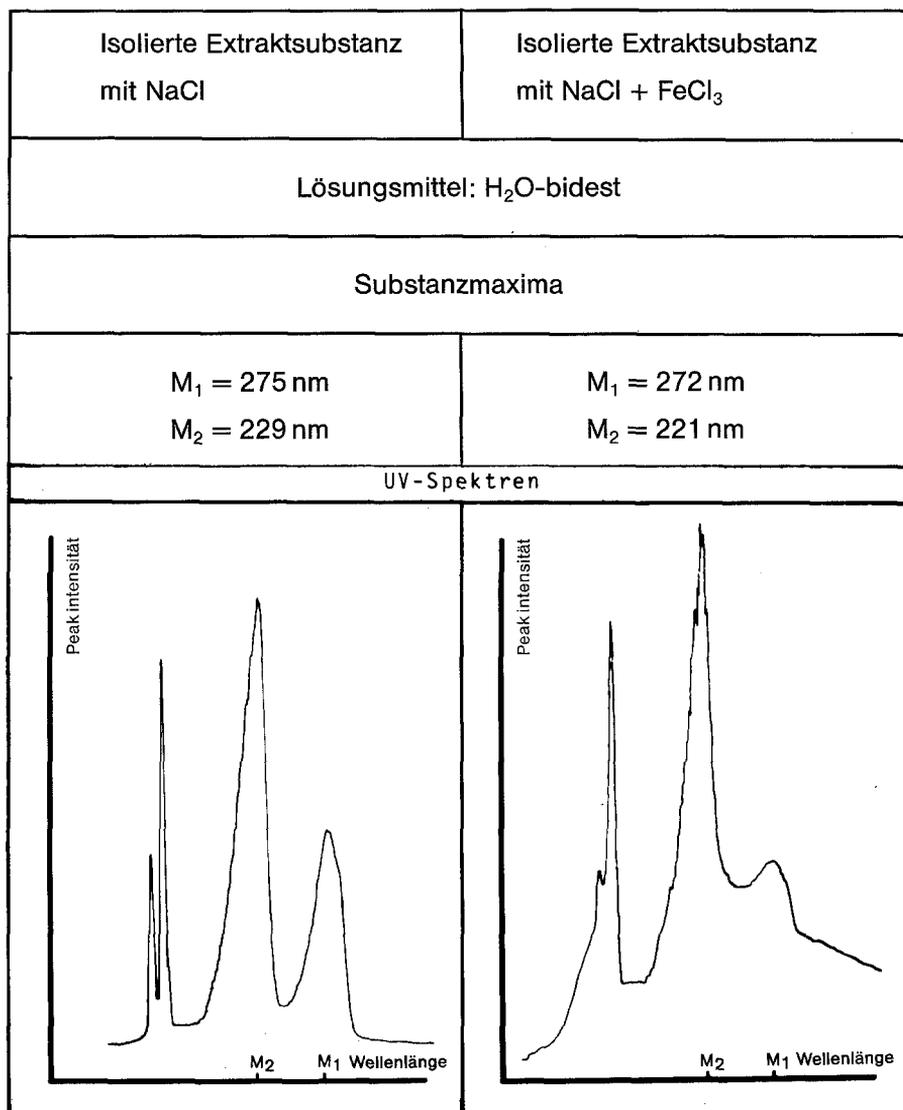


Abb. 6. UV-Spektren des Wirkfaktors im Gemisch mit NaCl. Links ohne, rechts mit FeCl₃-Zusatz. Die Peakintensität wurde gegen Wellenlänge aufgetragen und die Maxima (M₁, M₂) gesondert angegeben

verfahren zur Methode der Wahl. Der eindeutige Giftnachweis gelang in extrahierten Resten vom Erbrochenen oder Stuhl der Opfer, wobei die Bestimmung in alkoholischen Gewebsauszügen umstritten blieb. Zu den besonders aufsehererregenden Fällen, bei denen die physiologischen Experimente für die Verurteilung ausschlaggebend waren, gehörten die Gerichtsverfahren gegen Dr. P. Richter [9] und gegen M. A. Becker [8].

Das Auftreten eines unbekanntes kardioaktiven Störprinzips im Bioassay von Gewebsextrakten bei H. Scholz [1, 4] und F. Thomas [10, 11] bestätigte die

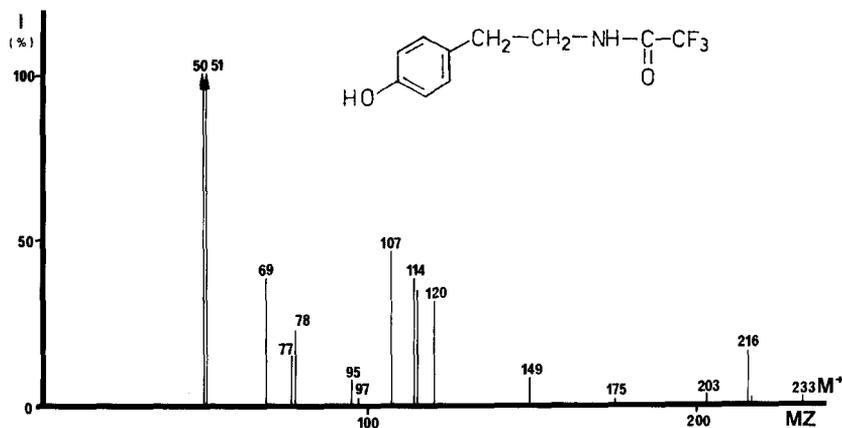


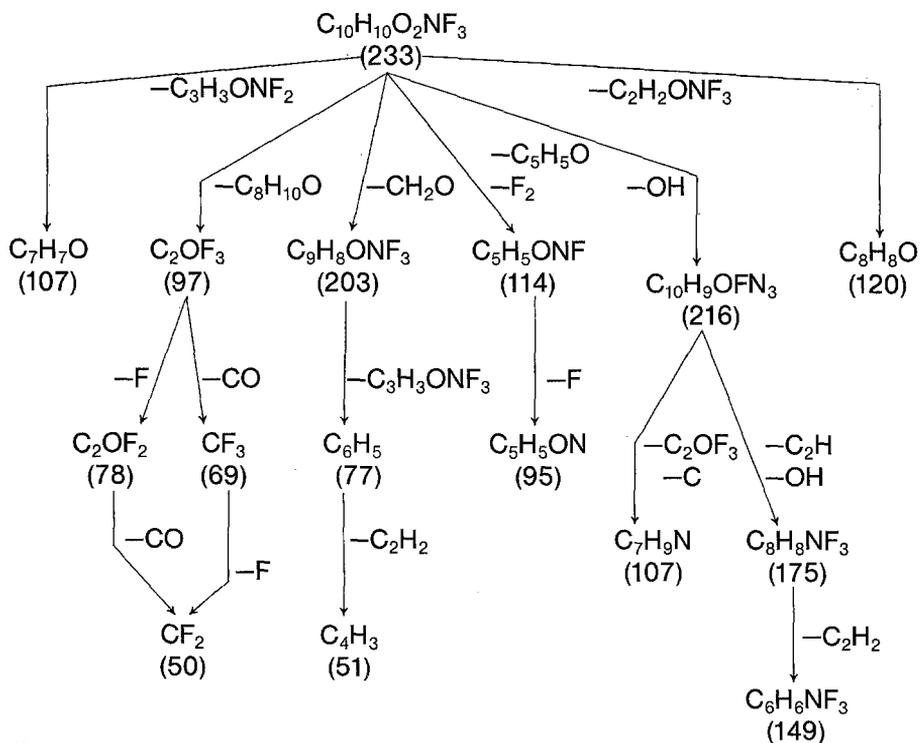
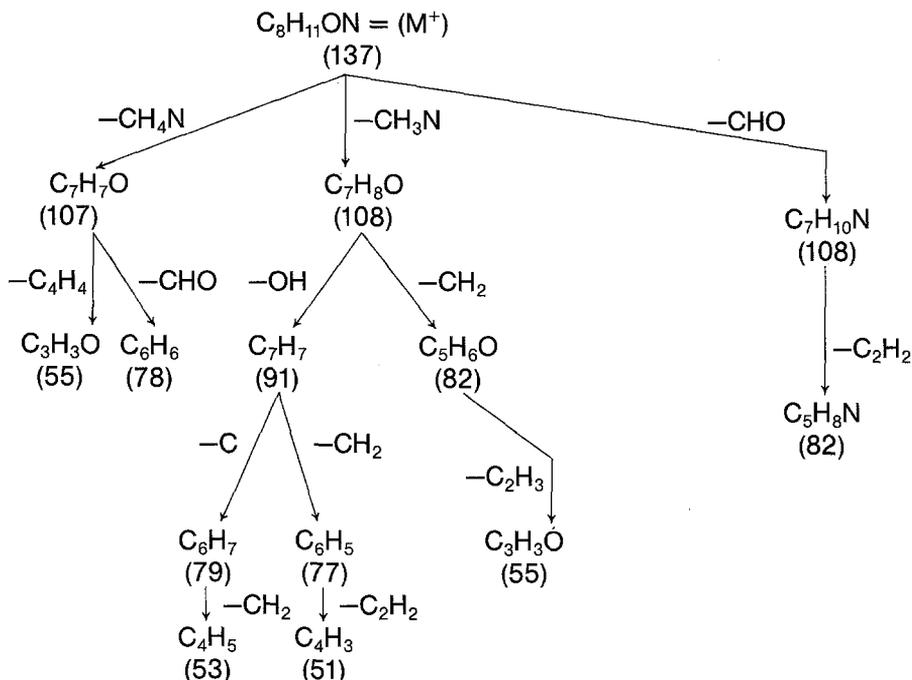
Abb. 7. Zerfallspektrum des mit TFAA derivatisierten Wirkprinzips, die Intensität $[I (\%)]$ wurde gegen die Massenzahl (MZ) aufgetragen, mit der zugehörigen Formel des N-(4-Hydroxy-phenäthyl)-n-methyl-trifluoroacetamids

alten Vorbehalte gegen diesen Nachweis. Die pharmakodynamischen Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zeigten, daß die positive Inotropie und Chronotropie der Extrakte wahrscheinlich einem einheitlichen Wirkprinzip zugeordnet werden kann. Der Befund einer Blutdruck- und Frequenzsteigerung am intakten Kreislauf des Ganztiers entsprach der p.i. und p.c. Wirkung am isolierten Herzen.

Die Befunde des Lagerungsversuches deuteten darauf hin, daß die gesuchte Substanz im Nierengewebe erst entstand bzw. wahrscheinlich als Folge eines enzymatischen Abbaus freigesetzt wurde.

Die chemische Natur des Wirkfaktors ergaben schrittweise die einzelnen Untersuchungen. Die Klärung der Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln unterschiedlicher Polarität und im Wasser deutete auf eine starke Polarität des gesuchten Prinzips hin. Die Anwesenheit polarer, eventuell geladener funktioneller Gruppen, bestätigten die Ergebnisse der Ionenaustauschchromatographie. Während durch den Anionenaustausch an Sephadex DEAE A-25 [7] bei sehr kleiner Retentionszeit keine ausreichende Reinigung möglich war, erbrachte der Kationenaustausch an Sephadex CM C-25 [7] einen effektiven Reinigungsschritt. Die Kardioaktivität des Faktors war stabil gegen Hydrolasen, thermische Belastung und extreme pH-Werte [5, 6], so daß ein Peptid als Wirkprinzip ausgeschlossen werden konnte. Das bestätigte auch die Gelfiltration mit Sephadex G-25 [12] und LH 11 [13].

Die chemische Identifizierung der pharmakologischen Aktivität als biogenes Amin gelang mittels Massenfragmentographie (Abb. 3), obwohl – wie die HPLC-Fraktionierung zeigt – die Substanz auch nach schonendem Kationenaustausch noch immer nicht völlig rein vorlag. Es wurden, auch nach Trifluoroacetylierung, die entsprechenden Fragmentierungsmuster des Tyramins nachgewiesen (Abb. 4, 8; 7, 9). Auch IR-Spektrum (Abb. 5) und UV-Spektrum (Abb. 6) waren denen des *p*-Tyramins [14, 15] identisch. Die phenolische OH-



Gruppe ließ sich nach Zusatz von FeCl_3 durch die charakteristische Änderung des UV-Spektrums nachweisen.

Die erste Isolierung von *p*-Tyramin gelang im Jahre 1885 aus gefaulten menschlichen Eingeweiden. Auch später wurde die Bedeutung des Verwesungsprozesses für die Anreicherung von *p*-Tyramin nachgewiesen [16, 17]. So bestätigten die Ergebnisse des Einflusses der Lagerungsdauer das *p*-Tyramin als Wirkfaktor.

Es zeigt sich eine deutliche Übereinstimmung zwischen den pharmakologischen Wirkungen und *p*-Tyramin. Wie der Extrakt zeigt *p*-Tyramin als indirektes Sympathomimetikum eine ausgeprägte p.i. und p.c. Wirkung. Diese Aktivitäten wurden in zahlreichen Untersuchungen an unterschiedlichen Präparaten beschrieben [18, 19]. Hinzu kommt die bekannte Verstärkung des Blutdruckes [20], die sich mit den Ganztierversuchen dieser Studie deckt.

Scholz stellte durch die Extraktgabe am isolierten linken Vorhof reserpinisierter Meerschweinchen keine Veränderungen der positiven Inotropie fest und schloß so zunächst im Widerspruch zu unseren Befunden die indirekt wirkenden Sympathomimetika als das gesuchte Wirkprinzip aus [4]. Allerdings kann die Vorbehandlung der Versuchstiere mit Reserpin zu einer nicht ausreichenden Entleerung der vom Tyramin genutzten Depots geführt haben. Eventuell wurde eine Verminderung des Effektes nicht festgestellt, weil keine quantitative Auswertung des Kontraktilitätswachses durchgeführt wurde. Darüber hinaus

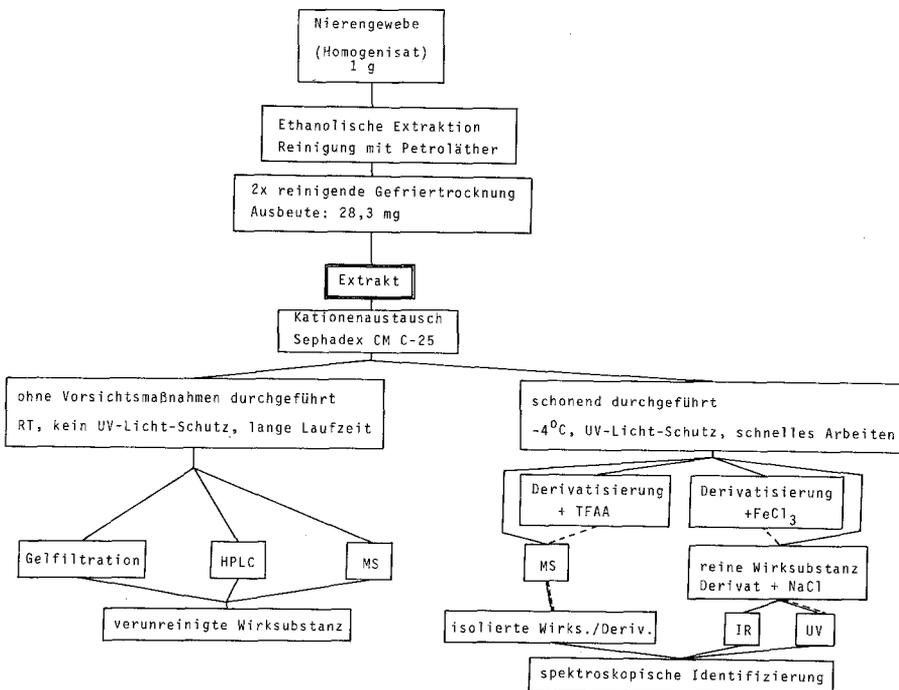


Abb. 10. Schema für die Aufarbeitung des Nierengewebes mit der Abtrennung und Identifizierung des Wirkstoffes *p*-Tyramin

kann nicht ausgeschlossen werden, daß in seinen Auszügen ein anderes Wirkprinzip enthalten war, das mit dem hier untersuchten nicht identisch war.

Auch die veröffentlichten Befunde über das histaminähnliche Tyramin-Verhalten am Meerschweinchen-Ileum [21, 22] bestätigen *p*-Tyramin als Wirkstoff.

Schlußfolgerungen

Alle Befunde dieser Studie deuten darauf hin, daß der Verursacher der pharmakologischen Effekte in den von uns untersuchten menschlichen Nierenextrakten das biogene *p*-Tyramin ist [23] (Abb. 10).

Zur forensisch-toxikologischen Routine gehört die Untersuchung von Gewebsextrakten. Diese Studie zeigt jedoch deutlich, daß die pharmakologische Prüfung von Organextrakten an isolierten Organen erhebliche Probleme aufweist, wenn daraus Rückschlüsse auf enthaltene Wirkstoffe gezogen werden sollen. Insbesondere bei Auszügen aus Geweben, die sich im fortgeschrittenen Verwesungszustand befinden (z. B. exhumierte Gewebeproben), muß mit Effekten gerechnet werden, die auf Eiweißzersetzungsprodukte, z. B. das *p*-Tyramin, zurückzuführen sind. Solche Ergebnisse müssen daher besonders kritisch bewertet werden.

Danksagung. Für wertvolle Anregungen und Diskussionen danken wir Herrn Dr. med. R. G. Alken, Zentrum der Pharmakologie der J. W. Goethe-Universität Frankfurt/Main.

Literatur

1. Scholz H (1977) Gutachten. Betr.: Strafverfahren gegen R. Böse; Az. Schw. A/K 8/77. Biologische Untersuchung von Organextrakten im Hinblick auf positiv inotrope Wirkung
2. Kuhlmann J (1978) Verteilung von Herzglykosiden im Organismus, klinisch-pharmakologische Grundlagen der Therapie. Habilitationsschrift Klinikum Steglitz der Freien Universität Berlin
3. Aderjan R, Schmidt G (1979) Investigation of cardiac glycoside levels in human post-mortem blood and tissues. Determined by a special radioimmunoassay procedure. Arch Toxikol 42: 107
4. Scholz H (1979) Pharmakologie und Klinik tödlich verlaufender Glykosidintoxikationen: Versuch eines pharmakologischen Nachweises von Herzglykosiden in Leichenteilen. In: Hierholzer K, Rietbrock N (Hrsg) 83. Berliner Seminar 2, Physiologische und pharmakologische Grundlagen der Therapie. Vieweg, Braunschweig
5. Paraškevová J, Alken RG (1979) An extract from human kidneys with an cardiotonic effect. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol [Suppl] 307: 146
6. Paraškevová J, Alken RG, Rietbrock N (1980) Evaluation of positive inotropic and chronotropic activity exhibited by extracts from human kidneys, 302. In: Rietbrock N, Woodcock BG, Neuhaus G (eds) Methods in clinical pharmacology. Vieweg, Braunschweig Wiesbaden
7. Sephadex-Ionenaustauscher: Leitfaden zur Ionenaustauschchromatographie (1979) Pharmacia fine Chemicals, Upsala, Sweden
8. Thorwald J (1968) Das Jahrhundert der Detektive (Handbuch für Giftmörder, Bd 3). Droemer und Knauer, München Zürich
9. Fühner H (1929) Rektale Strophanthinvergiftung. Der „Fall Mertens – Dr. Richter“. Dtsch Med Wochenschr 55: 1408

10. Thomas F (1964) Milestone in forensic medicine: the Belgian contribution. *Med Sci Law* 4 : 155
11. Thomas F, LaBarre J, Renaux J, Draux E (1979) A therapeutic catastrophe, entailing 16 exhumations following the administration of oestradiol benzoate to prostatic cancer patients: identification of poisons. *Med Sci Law* 19 : 8
12. Sephadex-Gelfiltration in Theorie und Praxis (1967) Pharmacia fine Chemicals, Upsala, Sweden
13. Sephadex LH-20 chromatography in organic solvent (1977) Pharmacia fine Chemicals, Upsala, Sweden
14. The Aldrich Library of infrared spectra (1975, H 681) Aldrich Chemical Company, Milwaukee Wisconsin
15. Kaempe B (1964) Interfering substances by determination of poisons in autopsy material. II. Tyramine. *Acta Pharmacol Toxicol* 21 : 333
16. Rosenheim O (1909) The pressor principles of placental extracts. *J Physiol* 38 : 337
17. Barger G, Walpole GS (1909) Isolation of the pressor principles of putrid meat. *J Physiol* 38 : 343
18. Holmes JC, Fowler NU (1962) Cardiac effects of tyramine. *Circ Res* 11 : 364
19. Torchiana ML, Angelakos T (1963) Positive chronotropic and inotropic responses of isolated atria to acetylcholine and tyramine. *Arch Int Physiol* 71 : 762
20. Flournoy RW, Camp BJ, Krise GM (1969) Comparison in conscious goats of the effects of epinephrine, norepinephrine, and tyramine on blood pressure. *Proc Soc Exp Biol Med* 131 : 744
21. Grobecker H, Holtz P (1966) Über die Wirkung des Tyramins auf den isolierten Darm. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 255 : 491
22. Janssen K, Schulz R (1954) Die Stellung von Tyramin und Cadaverin bei der Spasmyolyse am Meerschweinchendarm. *Arzneimittelforsch* 4 : 406
23. Paraškevoová J (1982) Die Aufklärung und chemische Identifizierung eines herzhaft- und frequenzsteigernden Stoffes aus Extrakten von menschlichen Nieren. Teil der Dissertation, Universität Frankfurt

Eingegangen am 27. Juni 1983