

Erfahrungen mit der Papierchromatographie bei toxikologischen Untersuchungen

Von JOLANDA SCHMIDLIN-MÉSZÁROS

Aus dem chemischen Laboratorium (Leiter Dr. sc. techn. S. WEHRLI)
des Gerichtlich-Medizinischen Institutes der Universität Zürich (Direktor: Prof. Dr. med. F. SCHWARZ)

Meinem verehrten Chef, Herrn Prof. Dr. med. F. SCHWARZ, zum 60. Geburtstag

Am internationalen Kongreß für gerichtliche Medizin in Brüssel (1952) wurde erstmals über die Anwendung der Papierchromatographie in der forensischen Toxikologie berichtet¹. Dabei wurde eine Tabelle über die chromatographische Trennung von Barbituraten reproduziert. Die Ergebnisse waren damals noch nicht sehr ermutigend, lagen doch die mittleren r_F -Werte (Wanderungsgeschwindigkeit) für neun bekannte Derivate innerhalb eines relativ engen Rahmens, nämlich zwischen 0,80 und 0,97. Damit war keine signifikante Differenzierung erreicht. In der Zwischenzeit sind aber bereits Fortschritte erzielt worden, und die Methode hat eine weite Verbreitung gefunden.

Auch wir stellten uns schon vor Jahren die Aufgabe, die am Institut anfallenden toxikologischen Analysen regelmäßig auch durch papierchromatographische Untersuchungen zu ergänzen. Vorläufig haben uns die zahlreichen verschiedenartigen Einzelfälle zu interessanten Einzelstudien geführt. Mit der Zeit dürfte die Auswertung von Serienuntersuchungen gleichartiger Ausgangsmaterialien auch wertvolle statistische Erkenntnisse liefern.

Ein unter bestimmten Bedingungen klar definierbarer r_F -Wert ist heutzutage bei Reinheitsprüfungen von Substanzen zu einer Beweiskonstanten geworden. In der forensischen Toxikologie hat man allerdings nur selten reine Ausgangsmaterialien zur Verfügung. Vielmehr müssen die Substanzen in der Regel vorerst aus Organen oder Körperflüssigkeiten isoliert werden. Dennoch liefert die

¹ V. M. PALMIERI und C. ROMANO, *Arch. Ital. Sci. Farmacol.* 2 (1952) 3.

Papierchromatographie in bezug auf zahlreiche Wirkstoffe zuverlässige Untersuchungsergebnisse, vor allem, was Schlafmittel, Pyrazolone und Alkaloide betrifft. Hier hat sich uns die Methode schon in verschiedener Hinsicht bewährt:

1. Ermittlung des r_F -Wertes als zusätzliche Konstante zur Identifikation von Wirkstoffen.
2. Vergleich von Spurenmaterial und Kontrollmaterial.
3. Differenzierung unklarer Tüpfelreaktionen.
4. Differenzierung von chemischen Gruppenreaktionen.
5. Befreiung wirksamer Substanzen von Ballaststoffen (Reinigung).
6. Auftrennung von Gemischen (Kristallgemische, Sublimationsbeläge).
7. Semiquantitative Bestimmungen.

Wenn verschiedene Organrückstände in gleichen Mengen nebeneinander aufgetragen werden, ergeben sich unter Umständen auch biologische Einblicke (Verteilung, Depotbildung).

Selbstverständlich wird die Papierchromatographie andere gerichtlich anerkannte Untersuchungsmethoden nicht verdrängen, hingegen wertvoll ergänzen. Der Beweiswert ihrer Ergebnisse ist wohl nicht überall gleichrangig und gelegentlich sogar gering, zusammen mit anderen Analysendaten erleichtert sie aber unter Umständen eine Identifizierung ganz wesentlich und vermag besonders andere Resultate zu erhärten. Zudem sind Chromatogramme oder deren Photographien willkommene Dokumente.

Zur Extraktion der Stoffe aus dem Substrat bedienen wir uns eines modifizierten Ausschüttelungsverfahrens nach STAS-OTTO.

Die Organteile werden zerkleinert, mit Schwefelsäure angesäuert und mehrmals mit Alkohol kalt digeriert. Die vereinigten Extrakte dunstet man nach dem Filtrieren im Vakuum bis auf einen kleinen wässrigen Rest ein. Die wässrige Lösung sowie Körperflüssigkeiten (Urin, Serum, Liquor) werden mit Chloroform bei verschiedenen pH-Werten ausgeschüttelt. Man erhält dann:

- bei pH unter 3 (kongosauer): Barbiturate, bromhaltige Schlafmittel bzw. Carbaminsäurederivate
- bei pH 6,8 (neutral): Doriden, Persedon, einige synthetische Morphinderivate
- bei pH 8,2 (schwach alkalisch): die Morphingruppe, auch die meisten synthetischen Morphinabkömmlinge, Pyrazolone (schwach basische Alkaloid-Gruppe),
- bei pH über 9: Strychningruppe (stark basische Alkaloidgruppe).

Die Verteilung der Wirkstoffe ist nicht absolut, sondern entspricht der Löslichkeit in zwei Phasen, wobei die Löslichkeiten von verschiedenen Faktoren abhängig sind. Die einzelnen Chloroformfraktionen werden dann entwässert und nach dem Filtrieren ausschließlich bei Zimmertemperatur eingedunstet. Da der Rückstand oft dunkel gefärbt und ölig ist, bedarf es meistens weiterer Reinigungen (alkohol-wässrige Fällungen und Extraktion mit Chloroform), was häufig mit großen Verlusten der gesuchten Substanz verbunden ist. Es kann eine säulenchromatographische Reinigung, wie sie von

W. PAULUS und H. J. MALLACH² für die meistverbreiteten Barbiturate beschrieben wurde, von Vorteil sein. Die Studie über Sedormid von S. BISAZ³ beleuchtet ausführlich die diesbezüglichen Probleme.

Den gereinigten Rückstand teilen wir auf:

- a) für Tüpfelreaktionen,
- b) für die Mikrosublimation im Vakuum⁴,
- c) für papierchromatographische Untersuchungen,
- d) eventuell für spektrophotometrische Untersuchung.

Im folgenden sei kurz über einige unserer Erfahrungen bei der Anwendung der Papierchromatographie berichtet.

I. Schlafmittel

1. Barbiturate

Bei unseren Untersuchungen auf Barbiturate gelangte die eindimensionale, absteigende Papierchromatographie zur Anwendung. Dieses Verfahren scheint uns am übersichtlichsten und erlaubt am leichtesten Vergleiche von nebeneinander aufgetragenen Substanzen und Kontrollpräparaten. Als Papier verwenden wir Whatman Nr. 1 in der Größe von 32 × 57 cm. Nach Versuchen mit einer Reihe von Lösungsmitteln verwenden wir nun für Routineuntersuchungen Isoamylalkohol, gesättigt mit wässrigem Ammoniak, und lassen zudem in Ammoniakatmosphäre laufen. Wir halten diese Kombination deshalb für besonders geeignet, weil die Unterschiede der r_F -Werte erhöht werden. Die Wanderungsgeschwindigkeit der Barbiturate erwies sich als stark abhängig vom pH. Unsere diesbezüglichen Ergebnisse decken sich also mit denjenigen von L. G. ALLGEN⁵. Dieser Autor hat sich zudem mit der dunklen Fluoreszenz der Barbiturate im UV-Licht beschäftigt, weshalb auch wir die Chromatogramme vor oder nach der Entwicklung im UV-Licht prüften. Die Resultate waren nicht überzeugend. Wir fanden nämlich, daß bei der Untersuchung von Organrückständen häufig ganze Kolonnen fluoreszieren, so daß ein r_F -Wert nicht ermittelt werden kann und eine einwandfreie Deutung der Befunde kaum möglich ist.

Wir entwickeln deshalb die Chromatogramme mittels der Zwickerschen Reaktion⁶. Diese Probe besitzt auf der Tüpfelplatte, wie H. SCHREIBER⁷ erst kürzlich wieder hervorhob, lediglich eine breite Gruppenspezifität und kann durch keine analytischen Reagens-Variationen für eine bestimmte Substanz eigentlich spezifisch gestaltet werden. Trotzdem ist sie noch heute eine der wichtigsten Reaktionen in der Toxikologie geblieben. Die erfolgreiche Übertragung auf die Papierchromatographie erhöhte nicht nur ihre Gruppenspezifität, sondern ver-

² *Arzneimittel-Forsch.* 4 (1954) 391.

³ Diss. Zürich 1942.

⁴ F. KUENG, Diss. Zürich 1952.

⁵ *Svensk Farmac. Tidskr.* 188 (1953) 57 sowie ein uns 1955 zugeschnittenes Abstract.

⁶ J. J. ZWIKKER, *Pharmac. Weekbl.* 68 (1931) 975, *ib.* 69 (1932) 1178.

⁷ *Kriminalistik* 11 (1957) 328.

lieh ihr durch die nun möglich gewordene Auswertung des r_F -Wertes (unter Umständen mit Lösungsmittelvariation) und der Fleckengröße vielfach die Bedeutung einer qualitativen und semiquantitativen Bestimmungsreaktion.

Saccharin⁸ und Sulfonamide⁹, die ebenfalls eine positive Zwickersche Probe geben, haben sich bei unseren Untersuchungen bis jetzt noch nie als störende Substanz geltend gemacht, wobei wir die Sulfonamide dadurch ausschalten, daß wir die Chloroform-Extraktionen der Barbitursäurederivate in stark saurem Milieu vornehmen¹⁰.

Vorerst lassen wir die Papierchromatogramme bei Zimmertemperatur trocknen, setzen sie aber unmittelbar vor der Entwicklung dem Föhn aus. Die Entwicklung selbst erfolgt durch Bespritzen oder mit getränktem Wattebausch, unter Verwendung folgender Lösungen:

Lösung I: 0,25 % Kobaltnitrat in absolutem Äthylalkohol oder Methanol.

Lösung II: 0,3 % Piperidin in absolutem Alkohol oder Methanol.

Jedesmal nach dem Aufbringen einer Lösung wird mittels Föhn wieder sorgfältig getrocknet. Dadurch wird ein Zerfließen der Flecken vermieden. Hervorzuheben ist, daß die Anfärbung nicht augenblicklich erfolgt, sondern daß sich die lila Farbe der Flecken nur langsam einstellt.

Konzentrationen der Entwickler, wie sie sonst bei der Tüpfelreaktion verwendet werden, erwiesen sich hier als ungünstig, da die erste Lösung bei zu hoher Konzentration das ganze Papier rosarot anfärbt und die zweite Lösung einen mehr oder weniger intensiven Grauton hervorruft.

Besondere Aufmerksamkeit ist der Atmosphäre des Raumes zu schenken. Diese darf weder sauer noch chlorhaltig sein, ansonst Zersetzung eintreten kann und die Entwicklung der lila Farbe ausbleibt.

Während die entsprechenden Farbreaktionen auf der Tüpfelplatte nur für kurze Zeit haltbar sind, kann beim Papierchromatogramm im allgemeinen mit einer Haltbarkeit von mehreren Wochen gerechnet werden. Je nach der Konzentration der aufgetragenen Substanz kann sie sogar noch länger sein (monatelang). Eine Dokumentation ist also ohne weiteres möglich, nötigenfalls durch Photographie. Die Zeitangaben über die Haltbarkeit gelten allerdings nur für die Entwicklung mit Piperidin. Werden anstatt Piperidin Ammoniakdämpfe verwendet, was durchaus möglich ist, blaßt die lila Färbung rascher aus. Ein Überschuß von Ammoniak kann überdies die Entstehung von Hexaminkobalt(III)-barbiturathydroxyd bewirken und damit zu einer braungrauen Verfärbung führen, worauf bereits ZWICKER hinwies.

Was die Empfindlichkeit der Methode anbelangt, ist sie leider nicht sehr hoch. Sie liegt in der Größenordnung von einigen hundert γ . Immerhin zeigte sich, daß bei Suicidfällen diese Größenordnung in den Organextrakten meistens überschritten wird. An sich ist es möglich, bei der Durchführung der Zwickerschen Reaktion am

Papier schon geringere Mengen von etwa 10 bis 20 γ zu erfassen, doch wird dann im allgemeinen bei der Interpretation ein Unsicherheitsfaktor zu berücksichtigen sein. Will man am fertigen Chromatogramm zuverlässige r_F -Werte bestimmen, so sind größere Mengen nötig. Dies ist besonders dann der Fall, wenn man aus den entwickelten Flecken die Wirkstoffe wieder extrahieren, zersetzen und die Barbiturate sublimieren will.

Hier besteht übrigens ein einfaches Verfahren darin, daß man die Flecken mit Bleistift markiert, sie direkt am Papier mit Salzsäuredämpfen zersetzt, dann klein zerschneidet und die Schnitzel im Vakuumröhrchen der Mikrosublimation unterwirft.

Mit dem beschriebenen Verfahren lassen sich die Barbiturate bereits weitgehend trennen. Es ergeben sich folgende r_F -Werte:

Luminal	0,2 bis 0,4	(verzogen)
Veronal	0,5	
Dial	0,6	
Noctal	0,62	
Phanodorm	0,65	(mit lilabräunlichem Rückstand an der Auftragsstelle; seine Zersetzung ist geradezu typisch)
Numal	0,7	
Medomin	0,72	
Dipropal	0,75	
Pentobarbital	0,8	
Sandoptal	0,82	
Amytal	0,85	
Secondal	0,86	

Die Erfahrung auf verschiedenen Gebieten der Papierchromatographie hat uns allerdings gelehrt, niemals die absoluten r_F -Werte als einziges Kriterium für die Identifikation anzunehmen, sondern vor allem auf die vergleichenden relativen Wanderungsgeschwindigkeiten (Kontrollpräparate) zu achten. Wir tragen deshalb bei allen unseren Bestimmungen auf dem gleichen Papier immer auch bekannte Standardlösungen auf, die uns als Vergleichsbasis dienen.

Interessant erscheint uns die Arbeit von G. HUEBNER und E. PFEIL¹¹. Diese Autoren entwickeln die Barbiturate mit 0,1 % KMnO_4 -Lösung, wobei die Barbitale als helle Flecken auf rotvioletterm Grund erscheinen. Allerdings werden auch die Papiere angegriffen, so daß man des papierchromatographischen Vorteils der Zurückgewinnung von Substanz eventuell verlustig geht.

2. Doriden

In den letzten Jahren gelangten mehr und mehr Suicidfälle mit Doriden zur Beobachtung. Als α -Phenyl- α -äthylglutarimid ist dieser Stoff im Körper leicht abbaubar. So stellten F. GROSS, J. TRIPOD und R. MEIER¹² fest, daß nach peroralen Gaben bei Hunden im Harn kein Doriden zu finden war. Auch P. MÜLLER und F. ROHRER¹³, die über klinische Erfahrungen berichteten, heben hervor,

⁸ WAGENAAR, *ZBL. II. 1* (1932) 208.

⁹ B. BECK, *Microchim. Acta* 29 (1941) 206.

¹⁰ Literatur bei W. MOHRSCHEIDT, *Süddtsch. Apotheker-Z.* 90 (1950) 335.

¹¹ *Z. physiol. Chem.* 296 (1954) 225.

¹² *Schweiz. med. Wschr.* 85 (1955) 305.

¹³ *Schweiz. med. Wschr.* 85 (1955) 309.

daß auf Grund unveröffentlichter chemischer Untersuchung ein sehr rascher Abbau des Doridens im Körper anzunehmen sei. Unsere Erfahrungen decken sich mit diesen Beobachtungen. Extraktions- und Ausschüttelungsversuche zeigten immerhin, daß sich Doriden bei hohen toxischen Dosen (Suicidfälle) auch aus Organen ermitteln läßt, und zwar ergaben die schwach sauren bis neutralen chloroformischen Auszüge (pH 6,8 bis 7,0) die beste Ausbeute. Kristalle konnten wir aber bei der Vakuumsublimation nur in denjenigen Fällen erhalten, in denen uns Mageninhalt, Erbrochenes oder Getränke-rückstände zur Verfügung standen.

Bereits im ersten, von P. GERSTER, H. SCHOLER und M. ZUEGER¹⁴ publizierten Suicidfall mit Doriden konnten wir feststellen, daß dieses Präparat ebenfalls eine positive Zwikkersche Reaktion gibt, ein Umstand, der sich in der Papierchromatographie auswerten ließ. Der Farbton ist blaßlila und – was besonders betont sei – nicht lange haltbar. Ein nicht zu übersehender Nachteil liegt darin, daß relativ große Mengen (mg) aufgetragen werden müssen, um eine positive Reaktion zu bekommen. Wir haben deshalb eine weitere Entwicklungsmethode geprüft, nämlich mit K-Bi-Jodid-Lösung am Papier, und erhielten eine orangefarbene Farbreaktion.

Das K-Bi-Jodid als allgemeines Alkaloidreagens wurde in der Form eines modifizierten Dragendorff-Reagens verwendet: 850 mg Bismutylnitrat, in 10 cm³ Eisessig und 40 cm³ Wasser gelöst, 8 g KJ, in 20 cm³ Wasser gelöst. Beide Lösungen gemischt, in brauner Flasche aufbewahrt.

Vor dem Entwickeln mischt man 1 cm³ Stammlösung mit 2 cm³ Eisessig und 10 cm³ Wasser nach der Vorschrift von H. JATZKEWITZ¹⁵.

Ein unter Umständen entscheidender Vorteil dieser Entwicklungsmethode gegenüber der Zwikkerschen Reaktion besteht darin, daß die Substanz nicht in Mengen von Milligrammen aufgetragen bzw. vorhanden sein muß, um ein positives Resultat zu zeitigen, sondern daß hier schon Größenordnungen von 100 γ oder eventuell weniger genügen.

Als Lösungsmittel dienten uns entweder mit Wasser gesättigtes Butanol oder Butanol-Ameisensäure-Wasser im Verhältnis 11 : 1 : 7 oder Iso-amylalkohol, mit Ammoniak gesättigt. Durchwegs war die Wanderungsgeschwindigkeit des Doridens groß. Die r_F -Werte lagen im Bereich von 0,85 bis 0,9.

Wohl am zuverlässigsten läßt sich Doriden spektrophotometrisch von den Barbituraten abgrenzen, und zwar fanden wir in alkoholischer Lösung von Urinrückständen schwache Maxima im Bereich des UV, während die Barbitursäurederivate in neutralen oder schwach sauren Lösungen entsprechende Charakteristika nicht erkennen ließen.

Die Mikrosublimation im Vakuum lieferte nur einen schmierigen, etwas körnigen Belag mit unscharfen

Schmelzintervallen, so daß zwar eine Anreicherung von Doriden erreicht werden konnte, eine Identifikation auf Grund von Kristallisationsproben aber außer Betracht fiel. Damit treten Spektrophotometrie (typische Maxima) λ 264, 258, 252 $m\mu$ und Papierchromatographie als Nachweismethoden stark in den Vordergrund, bedürfen aber noch der Verfeinerung. Bezüglich der papierchromatographischen Untersuchungen halten wir vorläufig die Ansetzung mehrerer Proben mit verschiedenen Lösungsmitteln für unerläßlich und empfehlen eine Entwicklung sowohl mit dem Zwikkerschen Reagens als auch mit K-Bi-Jodid, um die bestehenden Nachweismethoden so weit als möglich auszuschöpfen. Nur auf diese Weise dürften zuverlässige Ergebnisse zu erwarten sein.

Unsere Versuche, Abbauprodukte des Doridens papierchromatographisch zu erfassen, scheiterten bis jetzt. Demgegenüber konnte die Forschungsgruppe der Ciba AG im Harn von Hunden, denen das Präparat verfüttert worden war, α -Phenylglutarimid in einer Ausbeute von etwa 4 % isolieren. An unserem Institut sind nun weitere diesbezügliche Untersuchungen nach der Methode von J. KEBRLE und K. HOFFMANN¹⁶ im Gange, doch kann über die Ergebnisse erst später berichtet werden.

Die Schwierigkeiten des papierchromatographischen Doriden-Nachweises hat kürzlich auch J. BÄUMLER¹⁷ hervorgehoben. Es wird in dieser Richtung noch einige Arbeit zu leisten sein.

3. Carbaminsäurederivate

1. Bromfreie: Sedormid

Über die Ermittlung von Sedormid bei Vergiftungsfällen hat an unserem Institut bereits S. BISAZ³ gearbeitet. Die damals gezogenen Schlußfolgerungen gelten noch heute. Die einzige einigermaßen typische Farbreaktion nach DRUMOND läßt sich auf die Papierchromatographie übertragen. Die getrockneten Papiere werden zuerst mit HNO₃- und anschließend mit Ammoniakdämpfen bräuchert. In Gegenwart von Sedormid zeigt sich dann ein gelber Fleck. Die Farbreaktion ist jedoch nicht stark. Damit sie eintritt, muß die Substanz in der Größenordnung von Milligrammen vorliegen. Wir haben die Probe schon in mehreren Fällen mit Erfolg angewendet. Ein positives Ergebnis ist allerdings nur nach einer Einnahme großer Mengen (Suicid) zu erwarten.

Der Vollständigkeit halber erwähnen wir, daß uns als Lösungsmittel jeweils Iso-amylalkohol/Ammoniak diene. Dabei kann der r_F -Wert mit 0,9 angegeben werden.

2. Bromhaltige

Hier kommen in erster Linie Adalin und Bromural in Betracht. Diese Medikamente werden im Körper rasch abgebaut, und dabei kann im Urin gelegentlich Brom nachweisbar sein. Wir suchten deshalb nach einer pa-

¹⁴ Schweiz. med. Wschr. 85 (1955) 991.

¹⁵ Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 292 (1953) 942.

¹⁶ Helv. Chim. Acta 39 (1956) 767.

¹⁷ Mitt. Lebensm. Hyg. 48 (1957) 135.

pierchromatographischen Nachweismethode für Brom. Mehrere vorerst ausprobierte Entwickler, so Goldchlorid, HCl, Stärke und KClO_3 , fuchsin-schweflige Säure, Kaliumchromat oder H_2O_2 , vermochten nicht zu befriedigen. Am besten hat sich uns bisher folgendes Vorgehen bewährt:

Verseifung der Substanzen am Papier, Oxydation des abgespaltenen KBr mit H_2O_2 in Essigsäure und Entwicklung mit Fluorescein. Dabei erscheint Tetrabromfluorescein (= Eosin). Die Verseifung erfolgt mit alkoholischer KOH (die etwa 50% Wasser enthält) bei etwa 100°C im Trockenschrank. Um die Einwirkung zu verlängern, wird das Papier wiederholt mit Wasser benetzt. Die Fluoresceinlösung verwenden wir in einer Konzentration von 0,01%. Zur Oxydation mischen wir H_2O_2 in Essigsäure, Verhältnis 1 : 10. Während bei der Entwicklung KBr rasch die rosarote Farbe des Eosins erscheinen läßt, verläuft die Reaktion mit Adalin und Bromural nur langsam. Die Erfassbarkeit liegt in der Größenordnung von 100 μ . Im übrigen verweisen wir auf F. FEIGL¹⁸, wo die Grundlagen der oben beschriebenen Farbreaktion näher erörtert sind.

Verschiedene Lösungsmittel haben etwas unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeiten zur Folge:

	KBr	Adalin	Bromural
Iso-amylalkohol/Ammoniak, gesättigt	0,05	0,9	0,85
Butanol/Ameisensäure/Wasser 11 : 1 : 7	0,05	0,88	0,86
Methyläthylketon/Alkohol/Wasser 70 : 15 : 15	0,75	Front	Front

Aus dieser Tabelle geht hervor, daß KBr erheblich langsamer läuft als die beiden Schlafmittel. Somit besteht eine Differenzierungsmöglichkeit zwischen primär vorhandenem KBr, das verhältnismäßig kurze Wanderungsgeschwindigkeiten zeigt, und dem durch nachträgliche Verseifung am Papier entstandenen KBr, dessen r_F -Wert demjenigen der bromhaltigen Schlafmittel entspricht.

II. Pyrazolone

FEIGL hat viele seiner Tüpfelreaktionen auf Papier übertragen und seine einschlägigen Ausführungen gelten zum Teil auch für papierchromatische Untersuchungen. Dies trifft unter anderem für den Nachweis von Pyrazolonabkömmlingen zu. In dieser Gruppe stehen Pyramidon und Antipyrin im Vordergrund.

Am Papier zeigt Pyramidon im UV-Licht eine rote Fluoreszenz, was ohne spezielle Behandlung zur Erkennung herangezogen werden kann und insofern ein einigermaßen typisches Identifizierungsmerkmal darstellt, als die am weitesten verbreiteten Fluoreszenzen eine gelbgrüne Farbqualität aufweisen.

Als Entwickler läßt sich u. a. Eisen (III)-chlorid in alkoholischer Lösung verwenden, mit welchem Reagens sich sowohl Pyramidon als auch Antipyrin rotviolett anfärben. Dabei besteht jedoch eine Differenzierungsmöglichkeit darin, daß die Farbe des Pyramidons verhältnismäßig rasch ausblaßt und braunbeige wird, während diejenige des Antipyrins monatelang haltbar ist. Nach unseren Beobachtungen ist diese Reaktion gegenüber Antipyrin empfindlicher als gegenüber Pyramidon. Salicylsäure

läßt sich übrigens mit Eisen (III)-chlorid ebenfalls entwickeln. Die Probe ist sogar sehr empfindlich. Die Möglichkeit einer Abgrenzung ist dadurch gegeben, daß die Farbnuance im Vergleich zu den Pyrazolonen eher lila-blau ist und daß die Salicylsäure überdies eindeutig langsamer wandert (r_F der Salicylsäure 0,2, des Pyramidons und des Antipyrins um 0,7 bzw. 0,8).

Bezüglich der Pyrazolone ergeben sich gut differenzierbare Farbnuancen auch bei der Entwicklung mit K-Bi-Jodid, und zwar färbt sich Pyramidon orange-gelb mit ziegelrotem Einschlag, während Antipyrin hell orange-gelb kommt. Eine weitere selektionierende Reaktion stellt die Färbung mit 1% KNO_2 und Essigsäure dar, indem dabei Pyramidon als lila Fleck erscheint und sehr rasch wieder verblaßt, Antipyrin hingegen türkisgrün entwickelt und lange haltbar ist. Schließlich färbt *p*-Dimethylaminobenzaldehyd Antipyrin rot bis lila, wogegen Pyramidon farblos bleibt oder leicht gelb wird.

Phenacetin, das häufig in Kombinationspräparaten mit Pyrazolonen vorkommt, läßt sich gegenüber Pyramidon durch eine Entwicklung mit Na-nitroprussiat + Piperidin und 1% $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ in 5% Schwefelsäure abgrenzen: Pyramidon kommt hellgrün, Phenacetin rot. Dabei ist darauf zu achten, daß nicht mit zu konzentrierten Reagentien gearbeitet wird, ansonst das Papier zerstört werden kann.

Beigefügt sei noch, daß Phenacetin – im Gegensatz zu Pyramidon und Antipyrin – mit K-Bi-Jodid keine Reaktion gibt und also auch dadurch unterschieden werden kann.

Eine im Hinblick auf die Differenzierung nicht uninteressante Beobachtung konnten wir bei der Verwendung verschiedener Lösungsmittel machen. Während mit Butanol-Ameisensäure-Wasser der r_F -Wert von Pyramidon 0,7 und derjenige von Antipyrin 0,8 beträgt, kehren sich die Verhältnisse bei der Anwendung von Isoamylalkohol (Ammoniak gesättigt) sozusagen um, indem hier nun Pyramidon eine Wanderungsgeschwindigkeit von 0,85 und Antipyrin eine solche von 0,65 bis 0,7 aufweist.

Gerade am Beispiel der Pyrazolone läßt sich die Arbeitsweise der Papierchromatographie in grundsätzlicher Hinsicht sehr schön demonstrieren, indem gezeigt werden kann, daß Einzelbefunde an sich vielleicht noch keinen oder einen nur geringen Beweiswert besitzen, daß aber die Heranziehung verschiedener Entwicklungsmethoden und Lösungsmittel schließlich eine ganze Gruppe von Befunden liefert, die zusammengekommen eine weitgehende Identifizierung und Differenzierung einer gesuchten Substanz erlauben.

III. Alkaloide

Bei der papierchromatographischen Untersuchung von Alkaloiden halten wir uns im wesentlichen an die grundlegende Arbeit von H. JATZKEWITZ¹⁹. Wir lassen immer

¹⁸ Spot Tests, Elsevier Publishing Co., Amsterdam 1954.

¹⁹ Z. physiol. Chem. 292 (1953) 94.

mehrere Chromatogramme gleichzeitig laufen, und zwar mit Butanol-Ameisensäure-Wasser. Die Entwicklung erfolgt in erster Linie mit dem modifizierten Dragendorff-Reagens. Da jedoch damit eine ganze Reihe von Substanzen erfaßt wird, differenzieren wir gleichzeitig auch mit diazotierter Sulfanilsäure, Eisenchlorid und *p*-Dimethylaminobenzaldehyd.

Während K-Bi-Jodid im allgemeinen sowohl mit den natürlich vorkommenden als auch mit den synthetischen Alkaloiden einen orangefarbenen Farbton gibt, nuanciert die diazotierte Sulfanilsäure wesentlich vielseitiger, allerdings auf Kosten der Empfindlichkeit. Die Entwicklung mit dem zuletzt erwähnten Reagens ist besonders für die Differenzierung des Cliradons von großer Wichtigkeit, indem dieser Stoff schon in Mengen von nur etwa 10 γ mit einer einzigartig leuchtend-gelben Farbe kommt. Mit dieser Probe konnten wir den ursprünglich vermuteten Wirkstoff Cliradon beim Tod eines Süchtigen ausschließen und als verwendetes Suchtmittel Heptalgin nachweisen, wobei dem papierchromatographischen Befund entscheidendes Gewicht zukam. Morphin kommt mit diazotierter Sulfanilsäure nicht leuchtend gelb, sondern karminrot und unterscheidet sich dadurch vom Cliradon schon durch die Farbe. Die Ermittlung des r_F -Wertes erhöht die Sicherheit bei der Deutung entsprechender Farbreaktionen.

Bei Alkaloiduntersuchungen wird man die Papierchromatographie besonders dann mit Vorteil anwenden, wenn durch die üblichen Ausmittlungsverfahren keine Kristalle erhalten werden können oder die Rohrückstände kein charakteristisches Spektrum im UV geben. In diesen Fällen, die gar nicht so selten vorkommen, wird man sich – abgesehen von Farbreaktionen – oft weitgehend auf r_F -Werte stützen müssen, wenn man nicht überhaupt auf eine Aussage über die Art des in Frage stehenden Wirkstoffes verzichten will.

Der Alkaloidnachweis hat die Toxikologen von jeher stark beschäftigt. Deshalb werden auch immer wieder einschlägige Erfahrungen publiziert. Was die papierchromatographischen Nachweismethoden betrifft, seien die Arbeit von E. VIDIC²⁰ sowie diejenige von P. SEIFERT und G. GOLDMACHER²¹ speziell angeführt.

Mit der Möglichkeit einer Selektionierung auf papierchromatographischem Wege haben die übrigen Untersuchungsmethoden auch auf dem Sektor der Alkaloide an Bedeutung noch gewonnen. So wird die schon vor mehr als dreißig Jahren aus unserem Institut erscheinene Arbeit von H. FISCHER²² über Spektrographie und Fluoreszenzmethoden wieder vermehrt zu beachten sein.

IV. Andere Stoffe

Wir sind in den vorhergehenden Abschnitten auf die Schlafmittel, die Pyrazolone und die Alkaloide deshalb etwas näher eingetreten, weil sie den Hauptanteil un-

serer Untersuchungen ausmachen. So hatten wir innerhalb etwa zweieinhalb Jahren 88 Schlafmittel- und 36 Alkaloidfälle zu begutachten.

Daneben fallen aber auch laufend Fälle an, in welchen andere Stoffe eine Rolle spielen. Wir möchten nur erwähnen, daß uns die Papierchromatographie schon öfters bei der Klärung von vermuteten oder tatsächlichen Abtreibungsdelikten, wo von den Schwangeren nicht nur ein einzelnes, sondern mehrere Mittel auf einmal eingenommen wurden, sehr dienlich war, indem sie die Ermittlung der wirksamen Substanzen stark erleichterte. Aus wieder anderen Sektoren seien zwei Fälle kurz beschrieben:

Fall 1

Der 88jährige A.R. verstarb nach kurzer Somnolenz. Die von den Angehörigen in einer Apotheke veranlaßte Untersuchung einer kurz vor dem Tode gelassenen Urinportion auf Gifte ergab eine positive Zwickersche Reaktion, die den Verdacht auf eine Barbituratintoxikation erweckte. Nach einer Farbskala soll die Intensität der Farbreaktion einem Barbituratgehalt des Urins von etwa 5 mg % entsprechen haben.

Da die Haushälterin testamentarisch begünstigt worden war und man bei der Hausdurchsuchung eine leere Packung von Dormona fand, kam sie in den Verdacht, ihrem Dienstherrn Schlafmittel verabfolgt zu haben. Es wurde die gerichtliche Sektion (Dr. med. E. HARDMEIER) zur Klärung der Todesursache angeordnet. Die dabei erhobenen Befunde vermochten die Hypothese einer Schlafmittelintoxikation weder zu erhärten noch zu widerlegen. An sich konnte ein akutes Herzversagen auf organischer Grundlage als Todesursache in Betracht kommen.

Die nach mehreren Methoden durchgeführten Organuntersuchungen verliefen bezüglich des Barbituratnachweises negativ. Auf der Tüpfelplatte war allerdings die Zwickersche Reaktion nicht sicher zu beurteilen, doch fiel sie in den Chromatogrammen eindeutig negativ aus.

Inzwischen stellte sich heraus, daß A.R. in ärztlicher Behandlung gestanden war und vom Arzt Tropfen mit Cedilanid und Coramin-Adenosin verordnet erhalten hatte. Diese Tropfen, die uns zur Untersuchung zugestellt wurden, gaben nun eine stark positive Zwickersche Reaktion mit einem lila Farbton. Bei getrennt durchgeführten Proben auf der Tüpfelplatte waren Cedilanid und Coramin negativ, Adenosin-Coramin (Ciba) hingegen positiv. Zwei anschließend angesetzte Chromatogramme, auf welchen Organrückstände sowie Tropfen von Cedilanid, Coramin, Coramin-Adenosin Ciba und als Vergleichssubstanzen zudem Lösungen von Luminal, Veronal, Sandoptal und Seconal (Bestandteil des Dormona) gleichzeitig aufgetragen wurden, ergaben bei der Entwicklung mit dem Zwickerschen Reagens eine lila Färbung mit Coramin-Adenosin Ciba, den Tropfen des Hausarztes und mit sämtlichen Barbituraten, keine Farbreaktion dagegen mit den Organrückständen, Cedilanid und Coramin allein. Es ist somit denkbar, daß das in den verordneten Tropfen enthaltene Adenosin-Coramin Ciba den Anlaß zu einer Fehldeutung der auswärts durchgeführten Zwickerschen Reaktion darstellte. Wir prüften die Schnellmethode der auswärtigen Untersuchung, mit welcher die Tropfen des Hausarztes, zu Normalurin zugesetzt, wahrhaftig Barbiturate vortäuschen könnten. Bei primärer Anwendung der Papierchromatographie wäre eine solche Fehldeutung weitgehend zu vermeiden gewesen, da sich das Coramin-Adenosin Ciba und die Tropfen auf Grund ihrer Wanderungsgeschwindigkeit am Papier gut gegenüber den Barbituraten abgrenzen lassen.

Bei weiteren Versuchen, die wir durchführten, zeigte sich, daß nur Coramin-Adenosin Ciba (pH 8 bis 8,5) positive Zwick-

²⁰ *Arzneimittel-Forsch.* 5 (1953) 291.

²¹ *Arch. Toxikol.* 15 (1955) 305.

²² Diss., Zürich 1925.

kersche Reaktion gab, eine Mischung der Einzelkomponenten Coramin und Adenosin (pH 6 bis 6,5) hingegen nicht.

Dieser Fall illustriert die Möglichkeit einer weiteren Differenzierung von positiven Zwickerschen Reaktionen durch die zusätzliche Anwendung der Papierchromatographie.

Fall 2

Am Leintuch eines Witwers wurden rote Flecken festgestellt, welche von der Familie übernatürlichen Kräften zugeschrieben wurden. Mit der Zeit richtete sich der Verdacht allerdings gegen einen Schüler der sechsten Primarschulklasse, der auch sonst allerhand Allotria trieb.

Wir hatten das Leintuch dann zu untersuchen. Die Flecken ließen sich mit 96prozentigem Alkohol extrahieren. Die Extrakte waren schwach gelb und trübe. Das im Vakuum eingedampfte Farbstoffkonzentrat zeigte ein pH von 7 bis 7,2 und schlug nach Zusatz von verdünnten Mineralsäuren in Rot um. Es mußte sich also um einen Indikatorfarbstoff handeln. Da im Leintuch neben dem Farbstoff auch Seifenrückstände vorhanden waren, ist der gelbe Farbton erklärt. Um übersichtliche Verhältnisse bezüglich des pH zu erhalten, setzten wir ein Papierchromatogramm mit Indikatorsubstanzen als Kontrollen an. Bei den vergleichenden Untersuchungen am gleichen Papier ließ sich feststellen, daß der zu identifizierende Farbstoff zur Gruppe der Dimethylaminoazobenzole gehörte.

Daß sich die Papierchromatographie in der forensischen Toxikologie im Verlauf der letzten Jahre einen wichtigen Platz erobert hat, braucht nicht speziell hervorgehoben zu werden. Wenn sie auch nicht als selbständige Methode angesprochen werden kann und bisherige Untersuchungsmethoden weder zu verdrängen noch zu ersetzen vermag, so gibt sie doch in vielen Fällen wertvolle Hinweise bezüglich der Identität von Substanzen, erlaubt Trennungen von Gemischen und liefert damit oft Ausgangsmaterialien, die sich dann chemisch oder physikalisch leichter weiterverarbeiten lassen als vorher. Es sei hier nur an die Spektrophotometrie erinnert, die bei toxikologischen Untersuchungen heutzutage

eine große Rolle spielt und die um so zuverlässigere Ergebnisse liefert, je sauberer Stoffgemische getrennt werden konnten. Der forensische Beweiswert papierchromatographischer Befunde wird im Einzelfalle durch zielgerichtete Kontrolluntersuchungen sorgfältig abzuwägen sein. Nachdem nun laufend Erfahrungen mit dieser Methode publiziert werden, ist aber mit einer raschen Zunahme des Erfahrungsgutes und damit auch mit einer ständig zunehmenden Schlüssigkeit der Untersuchungsergebnisse zu rechnen.

Zusammenfassung

Es wurden einige Erfahrungen mitgeteilt, die wir mit der Papierchromatographie bei forensisch-toxikologischen Untersuchungen machen konnten. Es handelte sich um Stoffe aus der Gruppe der Schlafmittel, der Alkaloide und der Pyrazolone. Wir kamen zum Schluß, daß die Methode die bisherigen Verfahren in wertvoller Weise ergänzt und das analytische Vorgehen erleichtert, sofern sie mit der nötigen Kritik angewendet wird. Das Hauptgewicht legten wir auf die Darstellung differenzierender Untersuchungen zur Ermittlung und Identifizierung der am häufigsten verwendeten organischen Gifte. Wir wiesen dabei auf die Bedeutung vor allem des relativen r_F -Wertes als selektionierendes und zugleich identifizierendes Merkmal hin. Durch Verwendung verschiedener Flußmittel konnte oft eine noch schärfere Eingrenzung der in Betracht kommenden bzw. gesuchten Wirkstoffe erreicht werden. Eine weitere Differenzierungsmöglichkeit besteht darin, daß bei einzelnen Stoffgruppen durch Farbreaktionen am Papier signifikante Farbnuancen zur Geltung kommen, die zum Teil als weitgehend charakteristisch für einen bestimmten Wirkstoff der betreffenden Gruppe bezeichnet werden können.