

### III.

(Aus dem pharmakologischen Institut der Universität Heidelberg).

#### Ein Beitrag zur quantitativen Bestimmung des Morphins\*).

Von

R. Gottlieb und O. Steppuhn.

In seiner Arbeit „Experimentelle Untersuchungen über die Gewöhnung an Morphin“ hat Rübsamen<sup>1)</sup> eine Methode der Morphinbestimmung angegeben, die darauf beruht, daß sich Morphin aus verdünnten Lösungen von Morphinsalzen bei gegen Phenolphthalein ganz schwach alkalischer Reaktion mit Chloroform ausschütteln und durch mehrmalige Ausschüttelung mit genügenden Chloroformmengen quantitativ in das Chloroform überführen läßt. Im Rückstande des abdestillierten Chloroforms wird das Morphin dann nach Gordin<sup>2)</sup> titriert.

Nach älteren Angaben (Nowak 1872<sup>3)</sup>) nimmt Chloroform weder bei saurer, noch bei alkalischer Reaktion Morphin auf. Daß das Morphin dagegen aus ganz schwach alkalisch reagierenden Lösungen seiner Salze reichlich von Chloroform aufgenommen wird, könnte vielleicht aus der weitgehenden hydrolytischen Dissociation der Morphinsalze in starker Verdünnung erklärt werden. Um diese Annahme zu prüfen, hat Rübsamen die bei der Dissoziation des Salzes frei werdende Säure titriert und dabei bei genügender Verdünnung einen der angewandten Menge des Morphins entsprechenden Säurewert erhalten, wenn er gleichzeitig einen Teil der freien Base durch „Ausrühren“ mit Chloroform entfernte. Diese Titration war aber nur unternommen worden, um die Aufnahme des Morphins bei dauernd ganz schwach alkalischer Reaktion zu erklären. Als Bestimmungs-

\*) Vgl. die Berichtigung zu der gleichnamigen Mitteilung von E. Winterstein in diesem Archiv Bd. 62 S. 430.

1) Rübsamen, Arch. f. exp. Path. u. Pharm. Bd. 59 S. 227 1908.

2) Ber. d. deutsch. chem. Gesellschaft 1899 S. 2871.

3) s. Nowak. Wiener Akad. Anz. 1872 p. 126. cit nach Chemisches Centralblatt 1872. p. 536.

methode ist die Titration der freiwerdenden Säuremenge nicht verwendbar und ist auch von Rübsamen für seine Versuche nicht verwendet worden, schon deshalb nicht, weil wie Rübsamen sagt, „von vorneherein nicht zu erwarten war, daß die Morphinbestimmung durch die freigewordene Säuremenge in Gewebsextrakten ausführbar wäre“. Trotzdem nimmt die Schilderung dieser gar nicht wirklich verwendeten Titration der bei der Hydrolyse der Morphinsalze frei werdenden Säure bei Rübsamen einen viel zu breiten Raum ein und ist von der tatsächlich verwendeten Bestimmung in der Darstellung nicht genügend auseinandergehalten. Dadurch ist die Beschreibung der Methode eine unklare geworden und konnte leicht mißverstanden werden, wie dies der Mißerfolg einer Nachprüfung durch Winterstein<sup>1)</sup> gezeigt hat.

Wir haben deshalb zunächst eine zutreffende Schilderung der Methode zu geben, wie sie von Rübsamen tatsächlich angewandt worden ist und wie sie auch uns bei der nochmaligen Nachprüfung gute Resultate ergab.

#### Beschreibung der Methode.

Wesentlich für das angewandte Verfahren ist die Chloroform-Ausschüttelung des Morphins aus verdünnten Lösungen seiner Salze bei dauernd ganz schwach alkalisch gehaltener Reaktion. Um nun die Reaktion der wässerigen Lösung dauernd ganz nahe dem Neutralitätspunkte zu halten, obgleich sie durch die allmähliche Aufnahme der freien Base in das Chloroform ihre Reaktion ändert, d. h. durch die Ausschüttelung mit Chloroform nach einiger Zeit gegen Phenolphthalein schwach sauer wird, muß während der Ausschüttelung fortwährend ein geringer Alkalizusatz gemacht werden, nach Maßgabe der durch den Indikator angezeigten Reaktionsänderung der wässerigen Schicht. Zu diesem Zweck war es bequem, an Stelle der gewöhnlichen „Ausschüttelung“ eine „Ausrührung“ durch ausgiebige Durchmischung beider Schichten mittels eines Rührers anzuwenden. Eine solche Ausrührung kann im offenen Becherglase vorgenommen werden, in das man aus einer neben dem Rührapparate angebrachten Bürette  $\frac{1}{10}$  Normallauge zutropfen läßt bis zu einer dauernd ganz schwachen Rosafärbung durch Phenolphthalein.

Es wird also wie folgt vorgegangen: Reines Chloroform — z. B. das Chloroform nach den Vorschriften des Arzneibuches von E. Merck — wird vorerst mit neutralem destilliertem Wasser ausgerührt. Zu jeder Ausrührung von 200 ccm Morphinsalzlösung wurden je 600 ccm dieses gewaschenen Chloroforms verwendet.

1) Winterstein, Arch. f. exp. Path. u. Pharm. Bd. 62 S. 139. 1910.

Das wässrige, schwach sauer reagierende und eingeeengte Filtrat von der Eiweißcoagulation alkoholischer Gewebsextrakte, resp. in den methodischen Versuchen eine 0,04 bis 0,1 Morphinum purum entsprechende Menge Morphinum sulfuricum in 200 ccm Wasser wurden zunächst in einem dickwandigen Becherglase mit  $\frac{1}{10}$  Normalnatronlauge unter Zusatz von Phenolphthalein neutralisiert. Die Lösung wurde sodann mit 600 ccm des mit Wasser gewaschenen Chloroforms unterschichtet und mittels eines Turbinenrührers ausgerührt. Die alsbald verschwindendeschwache Rosafärbung durch Phenolphthalein wird während des Rührens durch ein öfters wiederholtes Zutropfen von  $\frac{1}{10}$  Normalnatronlauge dauernd wiederhergestellt. Es ist dabei darauf zu achten, daß kein Überschuß von Natronlauge angewandt wird, da eine zu stark alkalische Reaktion (deutliche Rotfärbung!) den Übergang des Morphins in das Chloroform erschwert und zur Entstehung saurer Zersetzungsprodukte des Chloroforms führt. Nach etwa 10 Minuten dauernder Ausrührung wird der ganze Inhalt des Becherglases in einen Scheidetrichter gegossen und das Chloroform nach Trennung der beiden Schichten abgelassen. Die wässrige Schicht kommt hierauf wieder in das verwendete Becherglas zurück, der Scheidetrichter wird mit 600 ccm Chloroform nachgespült, die zur nächsten Ausrührung dienen. Es wird abermals 10 Minuten lang ausgerührt und dabei  $\frac{1}{10}$  Normalnatronlauge bis zu bleibend schwacher Rosafärbung zutropft. Die Ausrührung wird im ganzen 4—5 mal vorgenommen und die Chloroformauszüge vereinigt.

Zur Einhaltung der richtigen Reaktion ist noch folgendes zu beachten: Chloroform nimmt Phenolphthalein beim Ausrühren auf und entfärbt es; das Ablassen der wässrigen Schicht darf deshalb nicht dazu verleiten, einen Überschuß von Natronlauge zuzutropfen; vielmehr muß man sich vor jedem neuem Zusatz von Alkali davon überzeugen, daß auch bei Zugabe von neuem Phenolphthalein die Flüssigkeit doch farblos bleibt. Auch ist darauf zu achten, daß das Wasservolumen durch Nachspülen des Rührers usw. nicht allzusehr vermehrt werde.

Das bei der fünfmaligen Ausrührung verwendete Chloroform (3000 ccm) wird nun in einem Fraktionierkolben auf dem Wasserbade bis auf ein kleines Volum abdestilliert; der Rückstand von etwa 100 bis 200 ccm wird quantitativ und unter Nachwaschen mit Chloroform in eine Glasschale übergespült und auf dem Wasserbade zur Trockne eingedampft.

Zum Rückstande wird eine genau gemessene Menge von  $\frac{1}{10}$  Normalschwefelsäure zugefügt und etwas erwärmt, um alles freie Morphin

in Morphinsulfat überzuführen. Darauf wird absoluter Alkohol zugefügt in einer Menge die jedenfalls zur Lösung des Salzes genügt, und bis zu einem Rest von etwa 5–10 ccm eingedampft. Die alkoholische Lösung im Schälchen wird quantitativ in ein Meßkölbchen gespült und nach Gordin bestimmt.

#### Die Endbestimmung nach Gordin.

Das Verfahren zerfällt somit in eine Isolierung des Morphins, z. B. aus der wässerigen Lösung des Rückstands von Gewebsauszügen, mittels Chloroform und in die Endbestimmung nach Gordin. Winterstein hat diese Endbestimmung auf Grund der von Kippenberger<sup>1)</sup> erhobenen Einwände für unzuverlässig erklärt. Kippenberger hat allerdings gezeigt, daß die Fällung des Morphins durch Jodjodkalium und der damit verbundene Säureverbrauch durch die angewandten Säuremengen und durch das Mengenverhältnis zwischen Alkaloid und Wagnerschem Reagens beeinflusst wird. Dies mag für die Bestimmung größerer Alkaloidmengen von Bedeutung sein und die Anwendbarkeit der Methode einschränken, wenn man keinerlei Voraussicht über die ungefähre Menge des vorhandenen Alkaloides besitzt und den Säurezusatz sowie den Überschuß von Reagens nicht danach bemessen kann. Für die kleinen Morphinmengen, die bei der Verteilung des Morphins im Organismus in Frage kommen, kann man dagegen das Wagnersche Reagens in derartigem Überschuß zusetzen und die Normalschwefelsäure in einer für die Morphinmenge unter allen Umständen genügenden, aber noch keineswegs störenden Menge anwenden, sodaß die Reaktionsbedingungen stets optimale sind. In Rübsamens Versuchen z. B. wurde den Ratten höchstens 0,1 Morphin injiziert; bei den Bestimmungen, wieviel davon nach einer bestimmten Zeit noch im Körper nachweisbar war, konnten also nur Zentigramme in Betracht kommen. Für diese Mengen allein haben wir die Methode nachgeprüft. Sie werden durch die Gordinsche Bestimmung mit einer durchaus genügenden Schärfe ermittelt.

In der folgenden Tabelle I ist eine Reihe von Versuchen angeführt, in denen 0,1 g Morphinum purum in wechselnden Mengen von Alkohol oder Wasser und mit einem Zusatz von 5 ccm  $\frac{1}{10}$  Normalschwefelsäure mit einem reichlichen Überschuß von Wagnerschem Reagens gefällt wurden. Es wurde ein mehrfach umkristallisiertes Morphinum purum in 2 proz. Lösung in  $\frac{1}{10}$  Normalschwefelsäure verwendet. 5 ccm der Lösung entsprachen also 5 ccm  $\frac{1}{10}$  Normalsäure, die zu dem basischen Morphin zugefügt waren. Nach wechselndem Wasser-

1) Ztschr. f. analyt. Chem. Bd. 42 S. 101.

resp. Alkoholzusatz wurde mit Wagnerschem Reagens auf 100 ccm unter guten Umschütteln aufgefüllt und nach mehrstündigem Stehen die Säure in 75 ccm Filtrat zurücktitriert. Jeder Kubikzentimeter an fehlender  $\frac{1}{10}$  Normalsäure entspricht 0,0285 Morphinum purum.

Tabelle I.

Morph. pur. angewandt Gramm	R e a k t i o n s v e r h ä l t n i s s e					Morph pur. gefunden Gramm
0.100	5 ccm $\frac{1}{10}$ N-Säure	+	5 ccm $H_2O$	+	90 ccm W. R.	0.0989
0.100	5 "	"	+ 10 "	"	+ 85 " "	0.0989
0.100	5 "	"	+ 10 "	"	+ 85 " "	0.101
0.100	5 "	"	+ 15 "	"	+ 80 " "	0.0969
0.100	5 "	"	+ 5 ccm Alkoh.	+ 90 "	" "	0.0989
0.100	5 "	"	+ 10 "	"	+ 85 " "	0.100
0.100	5 "	"	+ 10 "	"	+ 85 " "	0.101

Auch die zugesetzte Säuremenge kann sehr gut innerhalb der Grenzen wechseln, die für den Säureverbrauch bei der Fällung der in Betracht kommenden Morphinmengen unter allen Umständen genügen. In der folgenden Tabelle II ist unter sonst gleichen Bedingungen nur die Acidität in dem Reaktionsgemische variiert. Von 3 ccm  $\frac{1}{10}$  NSäure auf 0,045 g Morphinum pur. an ist der Säuregehalt demnach genügend.

Tabelle II.

Morph. pur. angewandt Gramm	Acidität					Morph. pur. gefunden Gramm
0.0456	1.5 ccm $\frac{1}{10}$ N-Säure	auf	125 ccm	Reaktionsgemisch		0.0323
"	2.0 "	"	"	"	"	0.0404
"	2.5 "	"	"	"	"	0.0421
"	3.0 "	"	"	"	"	0.0441
"	4.0 "	"	"	"	"	0.0446
"	5.0 "	"	"	"	"	0.0441
"	7.0 "	"	"	"	"	0.0444
"	8.0 "	"	"	"	"	0.0456
"	10.0 "	"	"	"	"	0.0453
"	15.0 "	"	"	"	"	0.0451
"	20.0 "	"	"	"	"	0.0447

Löst man also Morphinmengen von 0,05 bis 0,1 in etwa 5—10 ccm Alkohol setzt 5 ccm  $\frac{1}{10}$  Normalschwefelsäure hinzu und füllt auf 100 bis 125 ccm mit Wagnerschem Reagens auf, so erhält man bei der Gordinschen Bestimmung genügend genaue Werte.

### Das Ausrühren mit Chloroform.

Die quantitative Überführung des Morphins in die sogen. Ausschüttelflüssigkeiten bietet bekanntlich besondere Schwierigkeiten. Die Beobachtung Rübsamens, daß Chloroform Morphin leicht aufnimmt, wenn man nur während der Ausschüttelung dauernd für ganz schwach alkalische Reaktion sorgt, ist demnach als ein Fortschritt anzusehen. Bei mehrfach wiederholtem „Ausrühren“ unter geeigneten Bedingungen geht Morphin dann annähernd quantitativ in Chloroform über. Wenn man z. B. Mengen von 0,05 bis 0,1 Morphinum purum in 200 ccm Wasser als Morphinsalz gelöst hat, und 4—5 mal mit je 600 ccm Chloroform ausrührt, so erhält man, wie unsere weiter unten mitzuteilenden Versuche zeigen, im Rückstande des abdestillierten Chloroforms bei der Bestimmung nach Gordin 94—99 Proz. des angewandten Morphins.

Durch eine einmalige Ausrührung oder Ausschüttelung kann man selbstverständlich nur einen Teil des Morphins in das Chloroform überführen. Leider ist Winterstein durch die oben erwähnten Fehler in der Beschreibung Rübsamens zu der Annahme verleitet worden, als hätte Rübsamen die Ausrührung nur einmal vorgenommen. Dieses Mißverständnis ist bereits durch eine kurze Berichtigung<sup>1)</sup> aufgeklärt worden. Tatsächlich hat Rübsamen, wie es bei jeder Ausschüttelmethode notwendig ist, solange ausgeschüttelt, resp. ausgerührt, als das Alkaloid überhaupt noch in deutlich nachweisbarer Menge übergang.

Eine annähernd quantitative Aufnahme des Morphins durch Chloroform erfolgt natürlich nur bei einem geeigneten Verhältnis zwischen der Menge des angewandten Morphin und der beiden Lösungsmittel. Wir haben den Übergang besonders für das Verhältnis von 200 ccm 0,5 ‰ Morphinlösung auf 600 ccm Chloroform studiert. Doch hat es sich gezeigt, daß Morphin auch aus konzentrierteren Lösungen seiner Salze z. B. 4 ‰, 6 ‰ und 8 ‰ nicht schlechter erfolgt. Die Bedingungen des Übergangs sind offenbar komplizierte.

Zur Beurteilung des Übergangs kann man bei reinen Morphin-salzlösungen das folgende einfache Verfahren verwenden. Morphinum hydrochloricum gibt noch in einer Verdünnung von 1 : 10 000 mit Wagnerschem Reagens eine deutliche Trübung; bei 1 : 12 000 ist sie nicht mehr deutlich. Prüft man nun, wie stark man die ausgeführte wässrige Lösung des Morphinsalzes konzentrieren

1) Vergl. Dieses Archiv. Bd. 62 S. 430.

muß, um die erste deutliche Trübung durch das Reagens zu erhalten, so läßt sich die in der wässrigen Schicht zurückgebliebene Menge Morphin annähernd beurteilen. Geprüft wurde, indem 3 cem der Lösung mit 0,5 cem  $\frac{1}{10}$  Normalsäure und mit 5 bis 8 cem Wagnerschem Reagens versetzt wurden. Sobald die erste Trübung im durchfallenden Lichte auftritt, ist die Konzentration 1 : 10000 erreicht.

Auf diese Weise läßt sich leicht feststellen, daß bei einer einmaligen Ausrührung von 100 mlgr Morphin in 200 Wasser mit 600 cem Chloroform 60 mlgr, d. i. 60 Proz. bei schwacher Rosafärbung durch Phenolphthalein in das Chloroform übergehen und 40 mlgr in der wässrigen Schicht zurückbleiben. Nach fünfmaliger Ausrührung mit je 600 cem Chloroform verbleiben von 100 mg Morphin nur 2—3 mg im Wasser, d. h. die Aufnahme ist eine nahezu quantitative.

Dies gilt aber nur für die Ausrührung des Morphins bei gegen Phenolphthalein ganz schwach alkalischer Reaktion. Bei saurer Reaktion geht kein Morphin in das Chloroform, bei stark alkalischer ist der Übergang ein geringerer, wie bei schwacher. Setzt man unter sonst gleichen Bedingungen zur Lösung des Morphinsalzes in 200 cem Wasser noch 2,5 cem N-Natronlauge, so gehen bei einmaliger Ausrührung von 0,1 Morphinum purum nur 25 Proz. in das Chloroform, während 75 Proz. im Wasser zurückbleiben; bei Zusatz von 5 cem N-Natronlauge gehen nur noch 13 Proz. in das Chloroform und 87 bleiben im Wasser. An Stelle von Natronlauge kann man auch Ammoniak oder Sodalösung zur Neutralisation verwenden; dies hat sogar den Vorteil einer geringeren Ameisensäurebildung bei einem eventuellen Überschuß. Dagegen ist der Neutralitätspunkt gegen Phenolphthalein nicht so scharf zu erkennen.

Mit den angegebenen Mengen Chloroform gelingt die Ausrührung auch bei Morphinlösungen in großer Verdünnung (0,05 bis 0,1 Morphin als Salz in 200 Wasser). Es ist deshalb für die Isolierung des Alkaloids aus den wässrigen Lösungen der enteweißten Gewebs-extrakte nicht notwendig stärker zu konzentrieren. Wenn man zur Enteweißung Salze zugesetzt hat, so liegt darin ein Vorteil, da sich bei stärkerer Konzentration die Salze abscheiden müßten. Ihre Gegenwart in der zur Ausrührung bestimmten wässrigen Morphinsalzlösung ändert übrigens, wie wir uns überzeugt haben, nichts an der Aufnahme des Morphins durch Chloroform.

Aus dem Gesagten ergibt sich, daß eine etwa fünfmalige Ausrührung bei dem angegebenen Verhältnis der beiden Lösungsmittel und bei ganz schwach alkalischen Reaktion (schwache Rosafärbung durch Phenolphthalein!) kleinere Morphinmengen — bis 100 mg —

quantitativ in das Chloroform übergehen läßt. Die Behauptung Wintersteins, daß die Morphinbase beim bloßen Ausrühren unmöglich quantitativ in das Chloroform übergehen könne, kann demnach nur für eine einmalige Ausrührung Geltung besitzen.

### Versuchsergebnisse.

Nach dem nunmehr genau geschilderten Verfahren haben wir zunächst eine Reihe von neuen Versuchen mit reinen Morphinsalzlösungen angestellt, die wir in der folgenden Tabelle III lückenlos mitteilen. Das Morphin wurde als Salz in der Menge von 4 bis 8,5 cg in 200 ccm Wasser gelöst, es wurde immer fünfmal mit je 600 ccm Chloroform ausgerührt, im Rückstand des abdestillierten Chloroforms das Morphin nach Gordin bestimmt.

Tabelle III.

Morphinbestimmungen in reinen Morphinlösungen.

Vers.	Morph. pur. angewandt	Morph. pur. wieder- gefunden	Differenz in g	Wiedergef. in Prozent	in der H <sub>2</sub> O Schicht Morph. in mg
I	0 0855	0.0808	0.0047	94.51	3.5
II	0.0855	0.0812	0.0043	94.98	5.5
III	0.0855	0.0824	0.0031	96.40	2.0
IV	0.0855	0 0839	0.0015	98.25	3.5
V	0 0427	0.0427	0.0002	99.54	1.5
VI	0.0427	0.0407	0 0020	95.33	0.5
VII	0.0923	0.0910	0 0013	98.60	—

Danach werden 94—99 Proz. des angewandten Morphins in das Chloroform aufgenommen, in der wässrigen Schicht sind nach fünfmaliger Ausrührung nur 1—6 Proz. geblieben. Die Morphinmenge, die sich der Bestimmung entzogen hat, entspricht somit annähernd den geringen im Wasser zurückgebliebenen Morphinresten.

Um die Anwendbarkeit der Methode für die Bestimmung in Gewebsextrakten darzutun und um zu zeigen, daß es mit ihrer Hilfe in der Tat gelingt, geringe Mengen von Morphin (bis 0,1 Morphinum purum) in verhältnismäßig kurzer Zeit von den Bestandteilen des Tierkörpers abzutrennen und mit befriedigender Genauigkeit zu bestimmen, haben wir zu einem gleichmäßigen Brei der durch die Hackmaschine zerkleinerten Körper von Mäusen 0,05 bis 0,1 Morphinum purum in Form von Morphinsalz hinzugesetzt und nach inniger Mischung mit Alkohol extrahiert, den Alkohol abgedampft, den Rückstand mit Wasser aufgenommen und nach einer Enteiweißung wässrige Auszüge ge-



wonnen, in denen wir die Bestimmung des zugesetzten Morphins durch Ausröhren mit Chloroform vornahmen.

Die Körper von Mäusen wurden mit Hilfe einer Fleischhackmaschine fein zerhackt und zu dem erhaltenen Brei 5—10 ccm Lösung von Morphinum hydrochloricum hinzugesetzt. Nach inniger Mischung wurde mehrmals mit Alkohol extrahiert, die vereinigten alkoholischen Auszüge durch Zusatz von 5 ccm  $\frac{1}{10}$  Normalsalzsäure angesäuert und abgedampft, der Rückstand mit warmem Wasser aufgenommen und durch Essigsäure-Hitze-Coagulation unter Kochsalzzusatz enteiweißt. Das Filtrat wurde bis unter 200 ccm eingeengt, in einen Kolben von 250 ccm gespült und in 2 Hälften geteilt, deren jede, auf 200 ccm gebracht, zur Ausrührung verwendet wurde. Die folgende Tabelle IV gibt die Resultate der Versuche wieder.

Tabelle IV.

Bestimmungen von Morphin nach Zusatz zu einem Brei von Mäuseorganen.

Versuch		Morph. pur. enthalten	Morph. pur. wiedergef.	Differenz in g	Wiedergef. in Prozent	Mittel- wert
I	zugesetzt	1. Hälfte	0.0684	0.0609	0.0075	89.53
	0.1368 g-Mo. p.	2. „	0.0684	0.0644	0.0040	94.16
II	zugesetzt	1. „	0.0513	0.0495	0.0018	96.50
	0.1026 g-Mo. p.	2. „	0.0513	0.0478	0.0035	94.86
III	zugesetzt	1. „	0.0578	0.0541	0.0037	95.60
	0.1157 g-Mo. s.	2. „	0.0578	0.0527	0.0051	91.18
IV	zugesetzt	1. „	0.0578	0.0541	0.0037	95.60
	0.1157 g-Mo. s.	2. „	0.0578	0.0567	0.0011	98.10

Der Brei der Körpergewebe einer Maus, ohne Morphinzusatz in gleicher Weise behandelt, gibt auf 5 ccm eingedampft noch kaum eine sichtbare Fällung mit Wagnerschem Reagens.

#### Fehlerquellen.

Es ist reines Chloroform anzuwenden. Bei der Ausrührung mit Chloroform Pharm. germ. E. Merck erhielten wir die oben mitgeteilten Resultate. Als wir aber Chloroform aus einer Drogerie bezogen — vielleicht war es daselbst schon lange aufbewahrt —, so waren die Resultate merklich schlechtere. Dabei hatte dieses Chloroform, wie die ungefähre Schätzung des in der wässrigen Schicht Zurückgebliebenen nach der für das Auftreten der Jodjodkaliumfällung nötigen Einengung zeigte, dennoch nicht weniger Morphin aufgenommen als sonst. Aber dieses Chloroform enthielt saure Zersetzungsprodukte, die bei der Destillation der angewandten Menge von etwa 3000 ccm zum Teil im Rückstande zurückbleiben und bei der Gor-

di n'schen Endbestimmung wie die zugesetzte  $\frac{1}{10}$  Normalsäure wirken, sodaß bei der Zurücktitrierung weniger Lauge verbraucht wird, die Morphinzahl also zu klein ausfallen muß. Ist das Chloroform einmal durch Zersetzung verunreinigt, so genügt auch eine vorherige Ausrührung mit neutralem destilliertem Wasser nicht, die störenden Produkte völlig zu entfernen.

Zum Vergleiche mit den oben angeführten Versuchen, die mit reinem Chloroform vorgenommen waren, führen wir den folgenden Versuch an, bei dem ein aus der Drogerie bezogenes Chloroform verwandt wurde. Obwohl wir unter den gleichen Bedingungen arbeiteten wie sonst, erhielten wir bei der Bestimmung des Morphins nach fünfmaliger Ausrührung von 0,1 angewandtem Morphin nur 0,0752 Morphinum purum, d. i. 75 Proz. zurück. In der wässrigen Schicht blieb aber nicht mehr Morphin zurück als sonst; der Fehler mußte in der Titration liegen. In der Tat zeigte das Chloroform, das mit Schwefelsäure Braunfärbung gab, einen deutlichen Geruch seines Rückstandes und die Titration des Rückstandes von 600 cem ergab nach der Aufnahme mit Wasser 0,4 cem  $\frac{1}{50}$  Normallauge, was für die ganze Menge des bei der Bestimmung verwandten Chloroforms (3000 cem) also fast 2,0 cem  $\frac{1}{50}$  Normallauge entspricht.

In einem anderen Versuche wurde zur Ausrührung des Morphins, das wie in den früheren Versuchen zu Mäusebrei zugesetzt war, wiederum Chloroform aus einer Drogerie verwendet, das einen etwas zersetzten, unreinen Geruch aufwies. Zugesetzt waren 0,0587 Morphinum purum, wiedergefunden wurde in der Hälfte der Lösung 0,0393, d. i. 68 Proz. Die andere Hälfte der Lösung wurde mit Chloroform ausgeführt, das teilweise von Merck stammte und das nur zum Teile durch das weniger zuverlässige Chloroform ergänzt war. Aus dieser anderen Hälfte wurden 86,7 Proz. wiedergefunden, also eine Zahl, die den Bestimmungen mit reinem Chloroform schon näher steht.

Auch Waschen eines verunreinigten Chloroforms mit Sodalösung beseitigt die störenden Produkte nicht, vielmehr bilden sich dadurch, wie gleich näher zu erörtern sein wird, aufs neue störende saure Zersetzungsprodukte, die auch bei nachfolgendem dreimaligen Waschen mit Wasser nicht mehr völlig zu entfernen sind.

Es muß also unzersetztes Chloroform angewandt werden. Dasselbe darf aber vor der Verwendung zur Ausrührung auch nicht mit Sodalösung oder Lauge gewaschen werden, sondern nur mit neutralem Wasser. Wenn man nämlich 600 cem Chloroform mit Wasser unter Zusatz von Natronlauge bis zu schwacher Rottfärbung durch Phenolphthalein anrührt, so läßt sich Ameisensäure und Chlor nachweisen, und zwar bei der nachträglichen Ausschüttelung mit reinem Wasser, sowohl in Chloroform als in der wässrigen Schicht. Die wässrige Schicht ergibt mit  $\text{AgNO}_3$  eine beträchtliche Trübung und die Ameisensäure kann nach Skala nachgewiesen werden. Dampft man das

abgelassene Chloroform mit alkoholischem  $\text{AgNO}_3$  versetzt ein, nimmt mit Wasser auf und filtriert, so verbraucht das Filtrat etwa 2 cem  $\frac{1}{50}$  Normallauge. Der auf dem Filter verbleibende Rückstand löst sich in  $\text{NH}_3$  und kann mit  $\text{HNO}_3$  wieder ausgefällt werden, ist also Chlorsilber.

Die Berührung des Chloroforms mit einem Überschuß von Alkali ist also unter allen Umständen zu vermeiden. Das Chloroform darf nicht mit Lauge oder Sodalösung vorher ausgerührt werden. Sonst gehen Säuren in das Chloroform über und machen die Bestimmung nach Gordin unmöglich.

Zur Illustration des Gesagten diene folgender Versuch, bei dem zu dem Rückstand eines mit Lauge behandelten Chloroforms erst nachträglich Morphin zugesetzt wurde; 600 cem Chloroform werden mit 200 cem Wasser und 30 cem  $\frac{1}{10}$  Normalnatronlauge eine halbe Stunde lang ausgerührt, das Chloroform wird abdestilliert, der Rückstand mit Alkohol und Wasser aufgenommen und nun erst nachträglich 0,05 g Morphinum purum zugesetzt. Bei der Ausführung der Gordinschen Bestimmung werden nur 50 Proz. des angewandten Morphins erhalten.

Aus dem Gesagten ergibt sich, daß 1. unzersetztes Chloroform angewandt werden muß und daß dasselbe 2. vorher nur mit Wasser, nicht aber mit Soda oder Lauge ausgerührt werden darf. Die Bildung von sauren in dem Chloroform verbleibenden Zersetzungsprodukten bei der Einwirkung von Alkali macht es weiterhin verständlich, weshalb auch 3. bei der Ausrührung des Morphins selbst, wie schon mehrfach hervorgehoben wurde, jeder stärkere Alkalizusatz vermieden werden muß. Ein Alkalizusatz bis zu deutlicher Rotfärbung des Phenolphthalein bedeutet sonst eine doppelte Fehlerquelle: erstlich geht bei stärkerer Alkaleszenz der Lösung weniger Morphin in das Chloroform über; dann aber bilden sich auch merklich saure Produkte, welche die Endbestimmung stören.

#### Schlußbemerkungen.

Ein näheres Eingehen auf die Kritik, der Winterstein die von Rübsamen angewandte Methode unterzogen hat, halten wir nicht für notwendig, weil diese Kritik in dem wesentlichsten Punkte auf einem Mißverständnis der Rübsamenschen Schilderung beruht. Wie schon erwähnt, hat Winterstein angenommen, daß Rübsamen auch bei der eigentlichen Bestimmung, wie bei seinen Vorversuchen über die hydrolytische Dissoziation der Morphinsalze, nur einmal ausgerührt hat. So ist es zu erklären, daß Winterstein die Möglichkeit der Ausrührung mit Chloroform bestreitet. Den anderen Einwand Wintersteins, daß die Gordinsche Endbestimmung unzu-

verlässig sei, glauben wir durch unsere Versuche widerlegt zu haben. Im übrigen sei ausdrücklich hervorgehoben, daß wir hier nicht entscheiden wollen, ob der Übergang des Morphins aus verdünnten Morphinsalzlösungen bei schwach alkalischer Reaktion gegen Phenolphthalein auf hydrolytischer Dissoziation des Salzes beruht; es könnte sich auch um den Übergang freier Morphinbase handeln, die nur durch Phenolphthalein nicht angezeigt wird.

Die übrigen Ausstellungen Wintersteins richten sich gegen die von Rübsamen gar nicht wirklich verwendete Titration der in verdünnten Morphinsalzlösungen durch Dissoziation freiwerdenden Säurewerte.

Diese Versuche Rübsamens sollten nur zur Erklärung des Überganges von Morphin in Chloroform bei ganz schwach alkalischer Reaktion gegen Phenolphthalein dienen. Sie sind von Rübsamen in unrichtiger Weise als eine „Bestimmung“ des Morphins bezeichnet worden. In der Tat ist sie von ihm aber nicht angewandt worden. Wenn Winterstein darauf hinweist, daß diese Titration als Bestimmung nicht brauchbar sei, so ist er durchaus im Rechte. Rein theoretisch betrachtet mußte allerdings Morphin in vollständig hydrolytisch dissoziierter Lösung wie jede sehr schwache Base auch durch Titration der Säure bestimmt werden können. Hierzu wäre jedoch eine Verdünnung von etwa 1 : 70000 des Morphinsalzes notwendig.

Praktisch ist es natürlich unmöglich, bei solchen Verdünnungen einen exakten Farbenumschlag der Indikatoren zu erhalten. Hingegen kann man schon bei viel geringerer Verdünnung annähernd richtige Werte erhalten, wenn man, wie dies Rübsamen getan hat, gleichzeitig eine Ausrührung mit Chloroform vornimmt, das wieder (vgl. oben!) nur mit Wasser und nicht etwa mit alkalischen Lösungen gewaschen sein darf. Wenn man dabei geeignete Verhältnisse wählt, z. B. 10 mg Morphinum purum als Salz in 65 cem Wasser oder 20 mg in 130 cem Wasser gelöst, und wenn man durch Ausrührung mit 200 cem Chloroform einen beträchtlichen Teil — bis 50 Prozent — des Morphins aus der stark hydrolysierten Lösung entfernt, so wird durch Erniedrigung der basischen Ionenkonzentration Gelegenheit zu erneuter Dissoziation geboten, und man hat dann eine annähernd vollständig dissociierte Lösung vor sich. Auch wir haben auf diese Weise annähernd richtige Werte durch Titration verdünnter Morphinlösungen und gleichzeitige einmalige Ausrührung mit Chloroform erhalten. Wir haben aber diese Versuche Rübsamens nicht weiter verfolgt, da sie mit der tatsächlich angewandten Morphinbestimmung nichts zu tun haben.

Das Ergebnis unserer Nachprüfung zeigt somit, daß die von Rübsamen angewandte Methode der Morphinbestimmung durch Ausrührung wässriger Morphinsalzlösungen mit Chloroform und Bestimmung des in das Chloroform übergegangenen Morphins nach Gordin in reinen Morphinlösungen etwa 94—99 Prozent, bei der Bestimmung

des Morphins in dem Brei der Körper von Mäusen bis 96 Proz., immer aber Werte um 90 Proz. des angewandten Morphins ergibt. Dabei sind als mögliche Fehlerquellen zu beachten, daß nur reines Chloroform verwendet werden und daß dasselbe vorher nur mit neutralem Wasser gewaschen werden darf, ferner ist eine ganz schwach alkalische Reaktion bei der Ausrührung inne zu halten. Die Fehlerquellen der Methode sind also leicht zu vermeiden. Die Raschheit ihrer Ausführung ist ein Vorzug gegenüber den bisher angewandten Methoden. Wenn Winterstein die Methode dennoch „unrichtig gedacht und praktisch unrichtig ausgeführt“ nennt, so ist diese abfällige Kritik wohl nur aus dem Mißverständnis der von Rübsamen gegebenen Schilderung zu erklären. Wir glauben nunmehr die Methode, wie sie Rübsamen tatsächlich angewandt hat, ausführlich genug geschildert und ihre Fehlerquellen ermittelt zu haben, und dürfen hoffen, daß auch weitere Nachprüfungen zu gleich brauchbaren Resultaten führen werden.

---