

Kommentar zum Österreichischen Arzneibuch 9. Ausgabe

Sci. Pharm., 34 (1966), 2, 147-166

Identifizierung organischer Substanzen nach L. Kofler

(Zu Abschnitt XI, Punkt 2 des Allgemeinen Teiles des ÖAB. 9)

1. Teil

Von

M. Kuhnert-Brandstätter

Im ÖAB. 9 ist die thermomikroskopische Methode zur Identifizierung organischer Stoffe als Wahlmethode zugelassen. Im allgemeinen Teil findet sich eine kurze Beschreibung der Apparatur und der Arbeitsweise und bei den einzelnen Monographien sind die Kennzahlen für die betreffenden Substanzen aufgeführt. Vor allem die Angaben in den Monographien sind mit Absicht sehr knapp gehalten, so daß ein Kommentar wohl seine Berechtigung hat.

Neben dieser im Arzneibuch verankerten Mikromethode soll im Kommentar aber noch eine weitere, ebenfalls von L. Kofler eingeführte Methode beschrieben werden, die zwar nicht im ÖAB. 9 enthalten ist, die sich aber in den nordischen Staaten als Schnellmethode für das Apothekenlaboratorium gut bewährt hat und die auch im Appendix zur Internationalen Pharmakopoe, der sich derzeit im Druck befindet, enthalten sein wird. Es handelt sich um die Identifizierung auf der Kofler-Heizbank. Obgleich die Heizbank in ihrer Anwendung dadurch begrenzt ist, daß sie nur auf Stoffe ausgedehnt werden kann, die unter 265° schmelzen, stellt sie doch infolge ihrer frappierend einfachen und schnellen Arbeitsweise ein im organisch-chemischen Laboratorium sehr beliebtes Gerät dar. Sie kann jedoch nicht als Ersatz für das Heizmikroskop gelten.

A. Mikroskopische Methode

Der Vorteil der mikroskopischen Arbeitsweise gegenüber der Makromethode ist vor allem der geringe Substanzverbrauch. Dazu kommt, daß für die Bestimmung des Schmelzpunktes im Gegensatz zur Kapillarröhrchenmethode das 24stündige Trocknen der Substanz im Exsikkator wegfällt. Außerdem kann man bei der mikroskopischen Bestimmung neben der Schmelztemperatur häufig Vorgänge beobachten, die ebenfalls für die Charakterisierung der Substanz verwertbar sind. Vor allem ermöglicht die mikroskopische Beobachtung des Schmelzvorganges eine empfindliche Prüfung der Reinheit eines Stoffes.

1. Apparatur

Der Mikroschmelzpunktapparat besteht aus einem elektrisch geheizten dosenförmigen Metallgehäuse (Abb. 1), das durch eine horizontale Platte in zwei Kammern geteilt ist. In der unteren Kammer befindet sich die Heizwick-

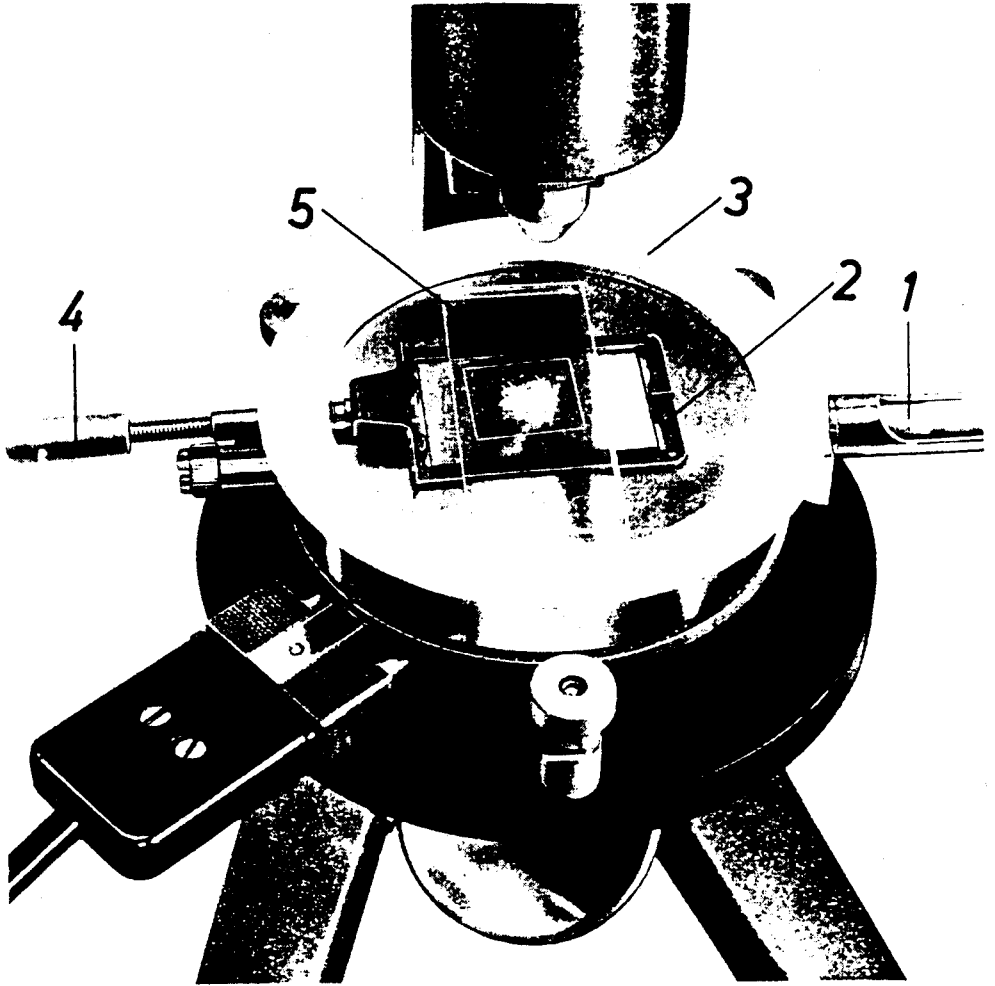


Abb. 1. Mikroschmelzpunktapparat

lung, die über einen Regeltransformator gespeist wird. In der Mitte der Heizplatte ist eine Bohrung zum Durchtritt des Lichtes angebracht. Eine seitliche Bohrung in der Heizkammer nimmt das Thermometer (1) auf, das an der Unterseite der Metallplatte anliegt, die den Heizraum von der Objektkammer trennt. In der Objektkammer befindet sich der Rahmen (2) des Präparatführers, der ein Verschieben des Präparates auf dem Heiztisch ermöglicht, ohne daß die Glasdeckplatte (3), die den Objektraum nach oben abschließt, entfernt werden muß. Der Präparatführer (4) kann um seine senkrechte Achse seitlich geschwenkt und durch Betätigung der Spindel längs der Achse derselben verschoben werden. Quer über den Objektträger wird eine Glasbrücke (5) gelegt, die den Zweck hat, für gleichmäßige Temperatur innerhalb des Präparats zu sorgen und insbesondere auch zu verhindern, daß bei stark flüchtigen Stoffen in der Mitte der Glasdeckplatte sichtstörende Sublimate auftreten. Zum raschen Abkühlen des Heiztisches zwischen den einzelnen Bestimmungen wird nach Entfernen der Glasdeckplatte, der Glasbrücke, des Präparats und des Präparatführerrahmens eine ca. 2 cm hohe Aluminiumplatte auf den Heiztisch aufgelegt.

Der Regeltransformator (Abb. 2) besitzt an seinem Drehknopf (1) eine Temperaturskala (2), mit deren Hilfe die Aufheizgeschwindigkeit reguliert werden kann. Erwartet man z. B. einen Schmelzpunkt von ca. 150° , so dreht man den Drehknopf des Transformators so weit, bis die Skalenmarke „ 150° “

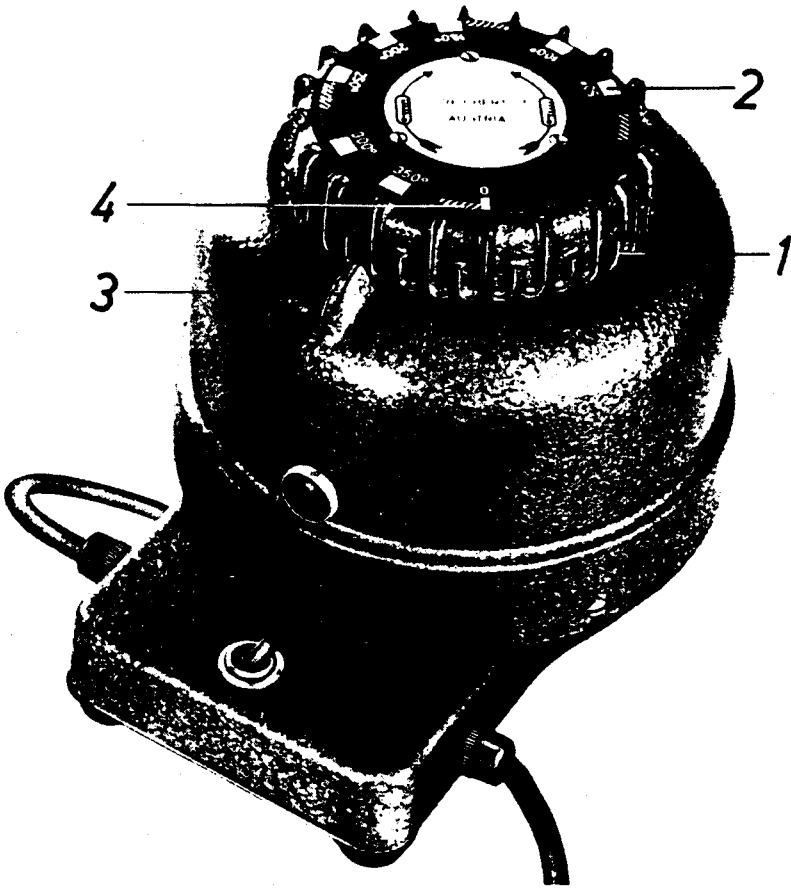


Abb. 2. Regeltransformator

der festen Marke am Gehäuse (3) gegenübersteht. Handelt es sich um eine Substanz, die ohne Verflüchtigung und ohne Zersetzung schmilzt, so wählt man die untere Grenze der breiten Markierung. Das Anheizen erfolgt anfangs rasch, im Bereich des Schmelzens dann etwa 2° pro Minute. Soll dagegen schneller angeheizt werden, so wird das rechte Ende der Skalenmarke eingestellt. Die schraffierten Segmente (4) der Skala bezeichnen die Stellen, an denen eine Veränderung des Drehknopfes keine Veränderung der Aufheizgeschwindigkeit zur Folge hat. Da die Netzspannung Schwankungen unterworfen ist und auch die Raumtemperatur nicht ohne Einfluß ist, wird empfohlen, die Übereinstimmung der tatsächlichen Aufheizgeschwindigkeit mit den Temperaturangaben am Regeltransformator von Zeit zu Zeit zu überprüfen.

Falls der Heiztisch längere Zeit nicht benützt wurde, ist es zweckmäßig, ihn vor Inbetriebnahme ohne Glasdeckplatte zur Trocknung aufzuheizen. Ebenso ist es empfehlenswert, sich durch Bestimmung eines Schmelzpunktes mit einer Testsubstanz (z. B. Phenacetin F. $134,5^\circ$) zu überzeugen, daß die Apparatur noch in Ordnung ist. Fehler kommen gelegentlich zustande, daß das Thermometer nicht bis zum Anschlag in den Apparat eingeführt wurde. Grundsätzlich werden korrigierte Werte abgelesen, da die Thermometer für den Heiztisch geeicht sind, sollte die Kontrolle mit den Testsubstanzen jedoch Abweichungen ergeben, so läßt sich durch Bestimmung mehrerer Punkte leicht eine Korrekturkurve festlegen.

Der Heiztisch ruht auf drei Füßchen und kann auf dem Objektisch der meisten Mikroskoptypen befestigt werden. Bei Neuanschaffung von Mikroskop

und Heiztisch empfiehlt es sich, für die Apotheke kein Spezial-Heizmikroskop, sondern ein einfaches Laboratoriumsmikroskop mit Revolver und fixiertem Heiztisch zu wählen, das zugleich für die mikroskopische Prüfung der Drogen verwendet werden kann.

2. Bestimmung der Schmelztemperatur

a) Herstellung eines Schmelzpräparates

Einige Kriställchen (ca. 0,1 mg) der Substanz werden auf einen Objektträger der Größe 26×38 mm (halbiertes Normalformat) gebracht und mit einem Deckglas bedeckt, das unter leichtem Verreiben an die Kristalle angedrückt wird. Große Kristalle, wie z. B. Phenazon, werden zweckmäßigerweise in einer kleinen Reibschale oder einfach zwischen zwei Objektträgern verrieben, da zu große Kristalltrümmer die Bestimmung stören. Das Präparat wird in den Rahmen des Objektführers gelegt, mit der Glasbrücke bedeckt und die Objektkammer mit der Glasdeckplatte verschlossen. Mit Hilfe des Präparatführers wird eine geeignete Stelle ins Blickfeld gebracht und der Drehknopf des Transformators so eingestellt, daß der Temperaturanstieg im Bereich des Schmelzens ca. 2° pro Minute beträgt. Für Stoffe, die unter Zersetzung schmelzen, ist ein Temperaturanstieg von 4° pro Minute vorgeschrieben. Auch wenn beliebige Substanzmengen zur Verfügung stehen, ist es notwendig, nur einige Kriställchen für das Schmelzpräparat zu verwenden, da zu dichte Präparate nicht nur die Sicht stören, sondern eventuell auch zu hohe Schmelztemperaturen ergeben.

b) Schmelzintervall

Von den drei üblichen Arten der Schmelzpunktbestimmung unter dem Mikroskop: durchgehende Bestimmung, Gleichgewicht und Schmelzintervall wurde letzteres für das Arzneibuch ausgewählt. Bei der Bestimmung des Schmelzintervalles läßt man die Temperatur ohne Unterbrechung bis zum vollständigen Schmelzen der Substanz ansteigen und liest den Schmelzbeginn und das Schmelzende ab. Im Mikroskop sieht man zuerst das Zerfließen der kleinen Kristallpartikel, dann folgen die größeren Kristalltrümmer und zum Schluß verflüssigen sich die von Schmelze umgebenen Kristallreste. Als Schmelzintervall wird die Temperatur abgelesen, bei der die ersten Schmelztropfen erscheinen und die Temperatur, bei der gerade die letzten Kristallreste verschwinden. Bei reinen und unzersetzt schmelzenden Stoffen beträgt das ermittelte Schmelzintervall durchschnittlich 1–2°. Größere Intervalle findet man in der Regel bei zersetzlichen Stoffen, doch auch mangelhafte Reinheit einer Substanz bewirkt eine Verlängerung des Schmelzintervalls, so daß die Bestimmung des Schmelzbeginns als Prüfung auf organische Verunreinigungen gelten kann. In Einzelfällen kann auch Polymorphie die Ursache für ein längeres Schmelzintervall sein (z. B. Phenyläthylbarbitursäure). Von der Benützung gekreuzter Polarisationsfilter ist zumindest für die Beobachtung des Schmelzbeginns abzuraten, wie überhaupt bei der Bestimmung des Schmelzintervalls im allgemeinen keine Notwendigkeit zur Verwendung dieser Einrichtung besteht.

c) Flüchtige Stoffe

Bei stark flüchtigen Stoffen mit hohen Schmelzpunkten kann es vorkommen, daß die ganze Probe verdampft, bevor noch der Schmelzpunkt erreicht

wird. Um vorzeitiges Verflüchtigen und daraus resultierende Irrtümer zu vermeiden, genügt es in vielen Fällen, eine größere Substanzprobe als üblich zu verwenden und den Heitzisch bis auf ca. 10° unterhalb der erwarteten Schmelztemperatur vorzuheizen. Falls diese Maßnahme nicht ausreicht, empfiehlt sich die Verwendung einer Polyäthylendichtung. Dazu wird aus einer Polyäthylfolie von ca. 0,3 mm Stärke ein quadratisches Blättchen ausgeschnitten, das die Ränder des Deckglases ca. 3–4 mm überragt. Die Folie wird über das Deckglas des Präparates gelegt und dieses bei ca. 120° auf den Heitzisch gebracht. Bei dieser Temperatur schmilzt die Folie zu einem zähen und durchsichtigen Film und ihre Ränder werden mittels eines Glasstabes oder einer Schaufelpinzette fest an den Objektträger angedrückt. Auf diese Weise läßt sich bei vielen Stoffen allzu heftige und sichtstörende Sublimation verhindern. Diese Art des Einschließens hat sich auch für die Bestimmung der Lichtbrechung der Schmelze bewährt, auf die wir später noch zurückkommen. Einzelne Substanzen, wie Hexachloräthan, entweichen allerdings auch durch die Polyäthylfolie hindurch und ihr Schmelzpunkt läßt sich im Objektträger-Deckglaspräparat nicht bestimmen. Doch ist in den genannten Fällen die Temperatur der vollständigen Verflüchtigung meist soweit reproduzierbar, daß die Identifizierung auf Grund von eutektischen Temperaturen möglich ist.

d) *Zersetzliche Stoffe*

Bei Substanzen, die unter Zersetzung schmelzen, wird das Schmelzintervall bekanntermaßen von der Aufheizgeschwindigkeit stark beeinflusst. Das Erhitzungstempo muß daher im Bereich des Schmelzens genau eingehalten werden, wenn man auch von stark zersetzlichen Stoffen reproduzierbare Werte erhalten will. In der Regel beträgt die Aufheizgeschwindigkeit 4° pro Minute im Bereich des Schmelzens, jedoch ist bei einzelnen Substanzen wegen der Gefahr des Verkohlens eine größere Rate vorgeschrieben.

Neben der Aufheizgeschwindigkeit kann auch die Korngröße der Kristalle und die verwendete Substanzmenge von Einfluß auf das Zersetzungsintervall sein, so daß die Reproduzierbarkeit grundsätzlich nicht so gut ist wie die von unzersetzt schmelzenden Stoffen. Es ist daher bei extrem stark zersetzlichen Stoffen wie den Corticosteroiden oder Penicillinen angezeigt, vom Schmelzen vereinzelter kleinster Partikel abzusehen und den Schmelzbeginn erst dann abzulesen, wenn ruckartig das Schmelzen der Hauptmasse beginnt. Außerdem empfiehlt es sich, bei der Bestimmung von Zersetzungsintervallen auf die Präparatmitte einzustellen, da am Rande der Probe die Zersetzung häufig früher einsetzt. Für die Beobachtung des Schmelzenden ist die Verwendung der Polarisationsvorrichtung in diesem Fall zu empfehlen, weil häufig durch Verfärbung der Schmelze und Gasblasenentwicklung die Sicht gestört ist.

3. Kennzeichnende Erscheinungen während des Erhitzens

a) *Sublimation*

Der Großteil der organischen Verbindungen ist mehr oder weniger stark flüchtig und bei etwa 70% der bisher untersuchten Substanzen läßt sich Sublimation beobachten. Die Probe verdampft während des Erhitzens teilweise oder vollständig vom Objektträger weg und wird vom Deckglas zum Großteil wieder aufgefangen. Je nach der Keimbildungsfähigkeit eines Stoffes tritt ein

Kristallines Sublimat oder nur ein tropfenförmiges Kondensat auf. In der Nähe des Schmelzpunktes bilden sich infolge verringerter Keimbildung neben den Sublimationskristallen häufig zahlreiche kleine Kondenströpfchen aus, die gewissermaßen als Vorboten für den nahenden Schmelzbeginn zu betrachten sind. Im allgemeinen sind stark flüchtige Stoffe auch kristallisationsfreudig. Bei manchen von ihnen schließen sich die ursprünglich einzeln liegenden sublimierten Kristalle zu geschlossenen Aggregaten zusammen, die ein straßenpflasterartiges Aussehen haben. Beispiele dafür sind Campher und Coffein.

Die Sublimationstemperatur ist keine Konstante, sondern stark von den Versuchsbedingungen abhängig. Man erhält aber annähernd reproduzierbare Werte (ca. $\pm 10^\circ$), wenn man die oben angegebene Arbeitsweise einhält und die Temperatur abliest, bei der die ersten Sublimate erkennbar sind. Die Angabe, ob und bei welcher Temperatur eine Substanz sublimierbar ist, stellt u. a. auch einen wertvollen Beitrag zur Charakterisierung einer Substanz dar. Die Differenz zwischen Sublimationsbeginn und Schmelztemperatur ist ein Gradmesser für die Flüchtigkeit. So finden wir für Diäthylbarbitursäure z. B. bei einem Schmelzintervall von $188\text{--}190^\circ$ die Sublimationstemperatur von 100° angegeben, woraus auf relativ gute Sublimierbarkeit geschlossen werden kann. Tatsächlich wird diese Eigenschaft bei forensischen Untersuchungen seit langem ausgenützt.

Die Form der Sublimate ist in den seltensten Fällen so spezifisch, daß man allein daran eine Substanz erkennen könnte, sie gilt aber als zusätzliches Charakteristikum, das neben den physikalischen Konstanten für die Identifizierung wertvoll ist. Bei der Beschreibung der Kristalle bedienen wir uns aus naheliegenden Gründen u. a. mehr geometrischer als exakt kristallographischer Bezeichnungen. Z. B. werden bei blättrigen Kristallen Rechtecke, Rhomben, Rhomboide u. dgl. unterschieden. Für prismatische Kristalle sind je nach Ausbildung Ausdrücke wie Nadeln, Spieße, Stengel, Balken usw. üblich.

Kristallwasser

Die Gegenwart von **Kristallwasser** — in selteneren Fällen handelt es sich um **organische Lösungsmittel** — kann sich beim Erhitzen unter dem Mikroskop in verschiedener Weise äußern. Häufig entweicht das Wasser unter Trübung der ursprünglich klaren Kristalle, bei kleinen Kristallen ist gelegentlich ein Hüpfen und Zerspringen zu beobachten. Sehr kleine Kriställchen verlieren das Wasser ohne sichtbare Erscheinungen. Bei einem Teil der Hydrate ist jedoch das Wasser so fest gebunden, daß es nicht vor Erreichen des Hydratschmelzpunktes entweicht. Der Schmelzvorgang eines Hydrats verläuft entweder homogen zu einer einheitlichen Schmelze (Penicilline) oder inhomogen unter Ausfallen wasserfreier Kristalle, wobei dann meist noch das Schmelzintervall der wasserfreien Substanz bestimmt werden kann. Ein Beispiel dafür ist Codeinhydrochlorid. Seltener kommt es vor, daß aus einem Teil der Hydratkristalle vor Erreichen der Schmelztemperatur das Wasser entweicht, während andere Kristalle als Hydrat schmelzen, z. T. wieder erstarren, um dann gemeinsam beim Schmelzpunkt der wasserfreien Form endgültig zu schmelzen (Zitronensäure, Glucose).

Zur Untersuchung von Hydraten hat sich die Paraffinölprobe sehr gut bewährt. Sie dient dazu, um polymorphe Umwandlungen, die ebenfalls unter Trübung der Kristalle erfolgen, von der Kristallwasserabgabe zu unterschei-



Abb. 3. Diäthylbarbitursäure
Prismen Fp. 183°

Nadeln Fp. 190°

Blättchen Fp. 176°

den. Es geht aber auch darum, die Kristallwasserabgabe bei Stoffen sichtbar zu machen, die sonst ohne besondere Erscheinungen ihr Wasser verlieren. Die Präparation ist sehr einfach, die Kristalle werden zwischen Objektträger und Deckglas mit einem Tropfen Paraffinöl versetzt und erhitzt. Bei den meisten Hydraten sieht man über 100° das Wasser in Form von Gasblasen entweichen, häufig schon makroskopisch an einem Schäumen des Präparates erkennbar. Da in Paraffin die vorzeitige Wasserabgabe verzögert bzw. verhindert wird, können bei vielen Hydraten auch homogene oder inhomogene Schmelzpunkte bestimmt werden. So gibt Oxalsäure im normalen Präparat zwischen 60 und 90° das Kristallwasser unter Schwarzfärbung ab, in Paraffin dagegen läßt sich bei 101° das Gleichgewicht des Hydrats einstellen. Für Stoffe, die das Kristallwasser erst bei relativ hoher Temperatur abgeben, verwendet man zweckmäßigerweise festes Paraffin.

Das Verhalten von Substanzen, die mit organischen Kristallflüssigkeiten kristallisieren, ist im Normalpräparat ganz ähnlich den Hydraten. Spezielle Untersuchungen in Paraffin sind infolge Löslichkeit nicht immer möglich.

c) *Polymorphie*

Trübung von ursprünglich klaren Kristallen während des Erhitzens oder Auftreten von zwei Schmelzpunkten bei einer Substanz bedeutet nicht immer Abgabe von Kristallflüssigkeit, sondern diese Erscheinungen können auch durch Polymorphie verursacht werden. Etwa 5–10% der organischen Stoffe fallen beim Kristallisieren aus Lösungsmitteln nicht in der höchstschmelzenden, als stabil bezeichneten Modifikation, sondern in einer instabilen bzw. metastabilen Form aus. Je nach den Stabilitätsverhältnissen der Modifikationen untereinander werden die instabilen Kristalle während des Erhitzens vollständig oder nur teilweise, in einzelnen Fällen aber überhaupt nicht umgewandelt. Umwandlungsvorgänge werden im allgemeinen nur an größeren Kristallen beobachtet. Bei normaler Beleuchtung ist eine Trübung ursprünglich klarer Kristalle zu erkennen, bei gekreuzten Polarisationsfiltern eine Änderung der Interferenzfarben. Praktische Bedeutung erhält die Polymorphie dann, wenn nur ein Teil der Substanz umgewandelt wird und der Rest bei der tieferen Temperatur der instabilen Modifikation schmilzt, so daß zwei Schmelzpunkte hintereinander auftreten. Vielfach ist nach dem Schmelzen der instabilen Modifikation bei weiterem Erhitzen vollständige oder wenigstens teilweise Kristallisation der Schmelztropfen in der stabilen Form zu beobachten. Die genaue Verfolgung des Schmelzvorganges ist deshalb besonders wichtig, weil