

Prom. Nr. 2944

Die Bestimmung des Morphins und der wichtigsten Nebenalkaloide im Opium

VON DER

EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN
HOCHSCHULE IN ZÜRICH

ZUR ERLANGUNG

DER WÜRDE EINES DOKTORS DER
NATURWISSENSCHAFTEN

GENEHMIGTE

PROMOTIONSARBEIT

VORGELEGT VON

Richard Huber

dipl. Apotheker Innsbruck

Österreichischer Staatsangehöriger

Referent: Herr Prof. Dr. J. Büchi

Korreferent: Herr Prof. Dr. H. Flück

Zürich 1959

Offsetdruck Schmidberger & Müller

Meiner Frau
und
meinen Eltern
in Dankbarkeit gewidmet

Die vorliegende Arbeit wurde an der chemischen Abteilung
des Pharmazeutischen Institutes der ETH in Zürich auf An-
regung und unter Leitung von

Herrn Prof. Dr. J. Büchi

ausgeführt. Meinem sehr verehrten Lehrer danke ich herz-
lich für das wohlwollende Interesse und die grosszügige
Förderung, die er meiner Arbeit angedeihen liess.

Auch Herrn Rudolf Schwegler, Verwalter am Phar-
mazeutischen Institut der ETH, danke ich für seine stete
freundliche Hilfsbereitschaft.

INHALTSUEBERSICHT

	Seite
1 EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG	1
2 DIE BESTIMMUNG DES MORPHINS IM OPIUM	2
21 Allgemeiner Teil	
211 Extraktion des Morphins aus dem Opium	3
212 Abtrennung der Hauptmenge an Begleitstoffen	6
213 Isolierung des Morphins	13
214 Bestimmung des Morphins	15
22 Experimenteller Teil	
221 Bereitstellung des Untersuchungsmaterials	
2211 Reinheitsprüfung und Gehaltsbestimmung der wichtigsten Opiumalkaloide	20
2212 Die Opiummuster	21
222 Ueberprüfung der Methoden zur Bestimmung des Morphins im Opium	22
2221 Die Pharmakopoe-Methoden	22
2222 Die nicht offizinellen Methoden	34
223 Vorschlag einer Morphinbestimmungsmethode als neue Pharmakopoe-Methode	46
3 DIE BESTIMMUNG DER WICHTIGSTEN NEBENALKALOIDE IM OPIUM	55
31 Allgemeiner Teil	
311 Die Trennung der wichtigsten Opiumalkaloide	56
312 Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Kodein, Thebain, Papaverin und Narkotin	57
32 Experimenteller Teil	
321 Ueberprüfung der Methoden zur Bestimmung der wichtigsten Nebenalkaloide im Opium	59
322 Eine neue Methode zur Bestimmung von Kodein, Thebain, Papaverin und Narkotin im Opium	61
4 ZUSAMMENFASSUNG	72
5 LITERATUR	73

Für die quantitative Bestimmung des Morphins im Opium sind zahlreiche Methoden ausgearbeitet worden. Die erste wurde im Jahre 1828 vom Apotheker Guillermond (46) angegeben. Hundert Jahre später konnte Jermstad (52) bereits eine Zusammenstellung von 125 Methoden zur Bestimmung des Morphins im Opium geben und bis heute hat sich diese Zahl annähernd verdoppelt. Die Gründe dafür liegen einerseits in der grossen praktischen Bedeutung, die der Morphinbestimmung für die Beurteilung des Opiums als wichtigstes Ausgangsprodukt für die Morphingewinnung zukommt und andererseits in der beträchtlichen Schwierigkeit, das Morphin neben einer grossen Zahl von Nebenalkaloiden und anderen Begleitstoffen quantitativ zu erfassen. Als weitere Schwierigkeit kommt hinzu, dass das Opium keinesfalls ein auch nur einigermaßen konstant zusammengesetztes Naturprodukt ist. Es wechselt nicht nur den Morphingehalt in weiten Grenzen (3-24 %), sondern enthält je nach Herkunft und Ernte auch ganz verschiedene Nebenalkaloide und sonstige Begleitstoffe.

Für die quantitative Bestimmung der Nebenalkaloide sind wesentlich weniger Methoden ausgearbeitet worden und die Wertbestimmung des Opiums ist nach wie vor ident mit der Bestimmung des Morphins allein. Da die Nebenalkaloide aber an der pharmakologischen Wirkung des Opiums mitbeteiligt sind und an sich als Arzneistoffe zum Teil eine grosse Rolle spielen, muss deren Gehalt zur richtigen Charakterisierung des Opiums auch bestimmt werden.

Es ist bis in die jüngste Zeit umstritten, welcher von den vielen bisher bekanntgegebenen Methoden zur Bestimmung des Morphins und der Nebenalkaloide der Vorrang zu geben ist. Die meisten befriedigen in mehrerlei Hinsicht nicht, weshalb die Entwicklung neuer physikalischer und chemischer Analysenmethoden immer wieder Anlass zur Ausarbeitung neuer Methoden gibt. Vorliegende Arbeit will einen Ueberblick über die in den letzten zwanzig Jahren veröffentlichten Verfahren zur Bestimmung der Opiumalkaloide geben. Darüber hinaus stellten wir uns die Aufgabe, einige dieser Methoden unter besonderer Zuhilfenahme chromatographischer Verfahren zu überprüfen und auf Grund der gemachten Erfahrungen eine neue Methode zur Bestimmung des Morphins und der Nebenalkaloide im Opium auszuarbeiten.

2 DIE BESTIMMUNG DES MORPHINS IM OPIUM

21 ALLGEMEINER TEIL

Es wurde vielfach versucht, die Morphinbestimmungsmethoden in Gruppen zusammenzufassen. Heute dürfte es nahezu unmöglich sein, die überaus vielfältigen Verfahren in wenige Gruppen einzuteilen und trotzdem den Charakter der einzelnen Methode voll wiederzugeben. So müsste man etwa eine Methode hinsichtlich der Extraktion zu den Kalkmethoden zählen, hinsichtlich der Abtrennung der Nebenalkaloide aber vielleicht zu den Ausschüttelungsverfahren. Für eine allgemeine Besprechung des Problems der Morphinbestimmung im Opium ist es daher vorteilhafter, den Gang der Bestimmung in einzelne Phasen einzuteilen, so wie es im Folgenden versucht wird.

Die meisten Morphinbestimmungsmethoden können in folgende Arbeitsphasen unterteilt werden:

- 211 Extraktion des Morphins aus dem Opium
 - 2111 mit Wasser
 - 2112 mit Wasser und Kalziumhydroxyd
 - 2113 mit Säuren
 - 2114 mit organischen Lösungsmitteln
- 212 Abtrennung der Hauptmenge an Begleitstoffen
 - 2121 durch Ausfällen der Nebenalkaloide
 - 2122 durch Ausnutzung der Löslichkeitsunterschiede
 - 2123 durch Chromatographie
 - 2124 durch Elektrophorese
- 213 Isolierung des Morphins
 - 2131 durch Ausfällen des Morphins als Base
 - 2132 durch Ausfällen des Morphins als Derivat
- 214 Bestimmung des Morphins
 - 2141 gravimetrisch
 - 2142 titrimetrisch
 - 2143 kolorimetrisch oder spektrophotometrisch
 - 2144 polarographisch
 - 2145 papierchromatographisch

211 Extraktion des Morphins aus dem Opium

2111 Extraktion mit Wasser

Bei der Extraktion des Opiums mit Wasser geht man von der Annahme aus, dass das Morphin in Form von wasserlöslichen Salzen vorliege, oder der natürliche Säuregehalt des Opiums ein vollständiges Ausziehen ermögliche. An und für sich entspricht die Extraktion mit Wasser somit einem Ausziehen mit verdünnten Säuren, da der pH-Wert wässriger Opiumauszüge in der Regel zwischen 4 und 5 schwankt.

Die älteren Bestimmungsmethoden strebten durchwegs einen konzentrierten Opiumauszug an, um bei der Fällung des Morphins die in Lösung bleibende Menge möglichst gering zu halten. Nach dem Helfenberger-Verfahren wird das Opium mit der zehnfachen Menge Wasser verrieben und einige Zeit bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Andere Verfahren (45, 77) erwärmen die wässrige Opiumanreibung einige Zeit auf 50-60°. Bei allen Methoden, welche das Opium mit nur wenig Flüssigkeit durch Mazeration oder Digestion extrahieren, ist es nicht möglich, den gesamten Opiumauszug zu erhalten und weiter zu verarbeiten, da ein Teil der Flüssigkeit vom Opium festgehalten wird. In diesen Fällen wird das Morphin in einem aliquoten Teil des Auszuges bestimmt. Durch die Feuchtigkeit des Opiums einerseits und die Extraktstoffe andererseits erfährt die zur Extraktion angewandte Flüssigkeitsmenge eine gewisse Volumensvermehrung, welche bei der Bemessung des aliquoten Teils des Auszuges berücksichtigt werden muss. Meistens geschieht dies durch die Anbringung eines starren Korrekturfaktors, welcher durch willkürliche Festsetzung des Extraktgehaltes mit 60 % berechnet wird. Da der Extraktgehalt wässriger Opiumauszüge jedoch zwischen 40 und 80 % schwankt, ist diese Korrektur nur eine angenäherte. Um die sich daraus ergebenden Ungenauigkeiten zu vermeiden wurde wiederholt vorgeschlagen, die Feuchtigkeit und den Extraktgehalt für jedes Opiummuster eigens zu bestimmen und danach die weiterzuverarbeitende Menge Filtrat zu berechnen. Rusting (87) bewies aber, dass dadurch diese Fehlermöglichkeit nicht völlig ausgeschaltet werden kann, da vermutlich durch Adsorptionskräfte der Morphingehalt im Opiumrückstand und im Rest des Filtrates relativ grösser ist als in dem zur Bestimmung gelangenden Teil des Auszuges. Von Squibb (98) wurde deshalb eine mehrmalige Extraktion des Opiums mit Wasser vorgeschlagen, mit dem Vorteil, dass nun die gesamte Menge Morphin in den vereinigten Auszügen bestimmt werden konnte. Dieses Verfahren wurde in der Folge von den Arzneibüchern der USA übernommen. Die neuesten Morphinbestimmungsmethoden, welche das Opium mit

Wasser extrahieren lassen, behandeln das Opium wiederholt mit frischen Wassermengen und stellen Auszüge im Verhältnis 1:35 bis 1:125 her (21, 36). Um zu helleren und gereinigteren Auszügen zu kommen, wurde vielfach versucht, durch Zusatz eines Salzes die Menge der in den Auszug gehenden Begleitstoffe zu verringern. Statt mit reinem Wasser extrahierte man mit wässrigen Salzlösungen und verband so mit der Extraktion eine teilweise Abtrennung der Ballaststoffe. Die von älteren Verfahren angewandten Salze (Natriumchlorid, Natriumsalicylat, basisches Bleiazetat) haben sich nicht bewährt, da sie nicht nur die Löslichkeit der Ballaststoffe, sondern auch die des Morphins ganz erheblich herabsetzen. In neuerer Zeit wurde die Extraktion unter Zusatz von Bleiazetat (71) und Natriumsulfat (59) vorgeschlagen. Eine besondere Bedeutung hat die Extraktion mit Wasser unter Zusatz von Kalziumhydroxyd erlangt. Sie wird im folgenden Abschnitt besprochen.

2112 Extraktion mit Wasser und Kalziumhydroxyd

Diese Extraktionsweise beruht auf der Eigenschaft des Morphins, mit Alkali- und Erdalkalihydroxyden wasserlösliche Phenolate zu bilden, während die Hauptmenge der Nebenalkaloide ungelöst bleibt. Durch die Zugabe von Kalziumhydroxyd wird die Azidität des Opiumauszuges aus dem schwach sauren in den stark alkalischen Bereich verschoben und entspricht dann einem pH-Wert von ca. 12. In diesem Milieu werden die nichtphenolischen Alkaloide und eine erhebliche Menge von Ballaststoffen ausgeschieden. Erstere fallen als Basen aus, während die phenolischen Alkaloide und Narzein in Lösung gehen.

Wird das Opium nur durch einmalige Mazeration mit Kalkwasser extrahiert und das Morphin in einem aliquoten Teil des Auszuges bestimmt, so ist analog zur Extraktion mit reinem Wasser die quantitative Erfassung des Morphins nicht sichergestellt. Wird das Opium hingegen mehrmals hintereinander mit Kalkwasser behandelt, so kann eine vollständige Extraktion des Morphins erreicht werden (17). Rusting (87) schrieb vor, das Opium mit Kalziumhydroxyd und wenig Wasser zu verreiben und die Masse auf einem Filtertiegel abzusaugen, wieder mit Wasser aufzunehmen, erneut abzusaugen und dies bis zu einem Gesamtfiltrat von etwa der zehnfachen Menge des angewandten Opiums zu wiederholen. Zur Opium/Kalk-Mischung setzte Rusting (87) noch Manganchlorür zu und erreichte damit eine Verminderung an nichtalkaloidischen Extraktstoffen. Eder und Wackerlin (32) verbesserten diese Extraktionsweise, indem sie das Opium mit der fünfzigfachen Wassermenge extrahierten. In einer späteren Modifikation ihrer Ex-

traktionsweise schreiben diese Autoren (33) einen Zusatz von Mangansulfat vor, womit ein viel hellerer Kalkauszug erhalten wird, welcher sich zudem ohne Emulsionsbildung ausschütteln lässt.

2113 Extraktion mit Säuren

Die Extraktion des Opiums mit Säuren bringt gegenüber der Extraktion mit Wasser, welche wegen des natürlichen aber wechselnden Säuregehaltes des Opiums ebenfalls als Säureextraktion angesprochen werden kann, den Vorteil, dass die Extraktion immer bei einem konstanten pH-Wert erfolgt. Der wiederholte Säureauszug enthält die gesamten Alkaloide, sodass mit der Bestimmung des Morphins jene der Nebenalkaloide verbunden werden kann. Nachteilig ist jedoch, dass mit den Alkaloiden noch grosse Mengen nichtalkaloidischer Begleitstoffe, wie Harze und Farbstoffe, extrahiert werden und eine spätere Auftrennung erschweren. Aus diesem Grunde geriet diese Extraktionsweise in Misskredit und gewinnt erst durch die neueren Trennverfahren, wie Ionenaustausch und Papierchromatographie, wieder an Bedeutung. Zu berücksichtigen ist ferner, dass durch starke Säuren die Alkaloide besonders bei höherer Temperatur teilweise zersetzt werden können. Meistens erfolgt die Säureextraktion mit 0,1 n-Salz- oder Schwefelsäure, doch gibt es auch Verfahren, welche das Opium mit konzentrierter Ameisensäure (99) oder Eisessig (94) nahezu vollständig in Lösung bringen. Ähnlich wie bei der Wasser- und Kalkextraktion wurde auch bei der Extraktion mit Säuren versucht, durch Zusatz eines Salzes (Natriumsulfat) die in den Auszug gehende Menge an nichtalkaloidischen Begleitstoffen zu verringern (23, 58).

2114 Extraktion mit organischen Lösungsmitteln

Aeltere Verfahren wandten die Extraktion des Opiums mit organischen Lösungsmitteln ziemlich häufig an, sie wurde aber später durch die Extraktion mit Wasser und Kalkwasser fast vollständig verdrängt. Die Vor- und Nachteile sind ähnlich wie bei der Säureextraktion. Durch Verwendung eines geeigneten organischen Lösungsmittels kann die Gesamtheit der Alkaloide extrahiert werden, es wird jedoch auch ein grosser Teil der im Opium vorhandenen gefärbten Substanzen gelöst, wodurch die Isolierung der Alkaloide wieder erheblich erschwert wird. Erst nach Wiederentdeckung der Tswett'schen Adsorptionschromatographie gewannen die organischen Lösungsmittel wieder an Bedeutung zur Extraktion des Opiums, da man sich der Möglichkeit erinnerte, Pflanzenauszüge durch Verwendung geeigneter Adsorptionsmittel auf einfache Weise reinigen zu können.

Die neueren Verfahren verbinden diese adsorptive Reinigung des Auszuges mit der Extraktion, indem sie das Opium mit Ammoniak (zur Ueberführung der Alkaloide in die Basenform) und mit dem entsprechenden Adsorptionsmittel verreiben, die Mischung in eine Chromatographieröhre füllen und nun entweder zuerst die Nebenalkaloide durch ein geeignetes Lösungsmittel eluieren und dann das Morphin (41) oder sofort die Gesamtmenge der Alkaloide (37,101) durch Perkolation aus dem Opium herauslösen.

212 Abtrennung der Hauptmenge an Begleitstoffen

2121 Durch Ausfällen der Nebenalkaloide

In folgender Tabelle sind die pK -Werte der wichtigsten sechs Opiumalkaloide zusammengestellt. Aus ihr ersieht man, dass die Phenanthrenderivate Morphin, Kodein und Thebain stärkere Basen sind als die Isochinolinabkömmlinge Narkotin, Papaverin und Narzein. Das Morphin unterscheidet sich zudem von den Nebenalkaloiden durch seinen Phenolcharakter.

Tabelle 1 pK_B -Werte der wichtigsten Opiumalkaloide nach Schumacher (88)

$$pK_B = 13,96 - pK_A$$

Morphin	8,22
	9,29
Kodein	8,26
Thebain	8,46
Papaverin	6,36
Narkotin	6,60
Narzein	2,77
	9,43

Das Helfenberger-Verfahren benutzt den Basizitätsunterschied zwischen Morphin und Narkotin zur Trennung dieser im Opium in grösster Menge vorkommenden Alkaloide, indem das schwächer basische Narkotin durch Zusatz einer bestimmten Menge Ammoniak ausgefällt wird. Man nimmt dabei an, dass die zugesetzte Ammoniakmenge gerade genüge, um alles Narkotin und die übrigen schwächeren Basen zu fällen, ohne das Morphin niederzuschlagen. Die Unzulänglichkeit dieses Verfahrens ist oft und eingehend kritisiert worden (104). Der Zusatz einer konstanten Menge Ammoniak setzt voraus, dass die Azidität des Opiumauszuges immer dieselbe ist und dass das Mengenverhältnis von Morphin zu den Nebenalkaloiden in engen Grenzen konstant ist. Beide Faktoren treffen

aber bei dem so wechselnd zusammengesetzten Opium nicht zu. Die entscheidende Rolle spielen die im Opium vorhandenen fällungshemmenden Stoffe, welche verhindern, dass das Morphin, wie es eigentlich zu erwarten wäre, schon beim ersten Zusatz von Ammoniak gemeinsam mit dem Narkotin ausfällt. Die Menge und Wirksamkeit dieser die Kristallisation des Morphins hemmenden Stoffe ist aber wie die aller anderen Opiumbestandteile auch so inkonstant, dass darauf eine sichere Trennmethode nicht aufgebaut werden kann.

Durch das von Mannich (71) zur Ausfällung von Ballaststoffen verwendete Bleiazetat wird der Opiumauszug ebenfalls in seiner Azidität verändert. Es tritt eine Verschiebung des pH-Wertes aus dem schwach sauren in den annähernd neutralen Bereich hin ein, wodurch schwächere Basen (Narkotin) ausgefällt werden (siehe dazu die Bemerkungen auf Seite 35).

Der Phenolcharakter des Morphins liefert die zweite Möglichkeit zur Abtrennung der Nebenalkaloide durch Ausfällen derselben. Von ihr machen die Kalkmethoden gleichzeitig mit der Extraktion des Opiums Gebrauch. Durch das zugesetzte Kalziumhydroxyd wird der Opiumauszug stark alkalisch gemacht. In diesem Milieu fallen die Nebenalkaloide als Basen aus, während das Morphin auf Grund seiner phenolischen Hydroxylgruppe als Ca-Phenolat in Lösung geht. Die Abtrennung der übrigen Alkaloide ist jedoch nicht quantitativ. Narzein löst sich seiner Karboxylgruppe wegen und von den anderen Alkaloiden finden sich je nach ihrer Löslichkeit in Kalkwasser ebenfalls geringe Mengen im Kalkauszug.

2122 Abtrennung der Hauptmenge an Begleitstoffen durch Ausnutzung der Löslichkeitsunterschiede

Auf Grund der Löslichkeitsunterschiede der Opiumalkaloide in bestimmten organischen Lösungsmitteln ist eine sichere und rasche Abtrennung der Hauptmenge an Nebenalkaloiden und sonstigen Begleitstoffen vom Morphin durchzuführen. Dies kann entweder durch Extrahieren des wässrigen Opiumauszuges oder durch fraktionierte Extraktion des Opiums auf der Säule erfolgen.

In folgender Tabelle sind die Löslichkeiten der sechs in grösster Menge im Opium vorkommenden Alkaloide in einigen Lösungsmitteln zusammengestellt.

Tabelle 2 Löslichkeit der wichtigsten Opiumalkaloide (The Merck Index VI)

	Wasser		Aethanol		Aether	Benzol	Chloroform	Methanol
	15°	100°	15°	90°				
Morphin	5000	1100	210	98	6250	sl	1220	10
Kodein	120	60	2	1,2	18	13	0,5	gl
Thebain	1460			15	200	25	13	gl
Papaverin	ul		45	4	250	gl	sl	gl
Narkotin	3300		250		250	30	2	gl
Narzein	770	220		sl	ul	ul	ul	sl

gl = gut löslich, sl = schlecht löslich, ul = unlöslich

Die von verschiedenen Autoren angegebenen Löslichkeiten weichen zum Teil stark voneinander ab. Der Grund dafür kann in der vielleicht verschiedenen Bestimmungswiese liegen. Von grosser Bedeutung ist aber auch die Reinheit der Lösungsmittel und die Zustandsform der Alkaloide. Nach Prescott (84) ist frisch gefällte Morphinbase in Benzol im Verhältnis 1:2'000, nach Kristallisation dagegen 1:8'930 löslich. Eder (31) und Anneler (3) bestimmten die Löslichkeit des Morphins in Benzol mit 1:100 000. Bei der Löslichkeit des Morphins in Chloroform ist der Aethanolgehalt des handelsüblichen Chloroforms von grossem Einfluss. Sie beträgt in Handels-Chloroform 1:3'000 bis 1:5'000, in reinem, alkoholfreiem Chloroform dagegen 1:9'500.

Von grossem Einfluss auf das Lösungsvermögen von Alkoholen ist deren Konzentration. Die Löslichkeitsbestimmung des Morphins in Gemischen von Aethanol bzw. Methanol und Wasser ergab nach Baggesgaard-Rasmussen und Reimers (14) die in folgender Tabelle angegebenen Werte. Auffallend ist die starke Zunahme der Löslichkeit zwischen 90 und 100 proz. Lösungsmittel und besonders die Zunahme um mehr als das Zweieinhalbfache beim Uebergang von 99 zu 100 proz. Aethanol.

Tabelle 3 Löslichkeit der Morphin-Base in Methanol bzw. Aethanol

Gew. % Lösungsmittel	g Morphin/100 g	
	Methanol	Aethanol
10	--	0,0214
20	--	0,0325
26	0,0388	--
30	--	0,0596
50	0,135	0,178
70	--	0,294
75	0,373	--
90	0,710	0,342
99,1	--	0,995
100	5,382	2,549

Aus Tabelle 2 ersieht man, dass sich die Löslichkeit des Morphins in einigen Lösungsmitteln beträchtlich von der der wichtigsten Nebenalkaloide unterscheidet, wodurch sich gute Trennmöglichkeiten ergeben. Eine Ausschüttelung des Morphins aus stark alkalischer oder schwach saurer Lösung ist nicht möglich, da das Morphin darin als Morphinat (Anion) oder als Morphinsalz (Kation) gut löslich ist. Als Ausschüttelungsmittel eignen sich die vier niedrigsten aliphatischen Alkohole nicht, da sie mit Wasser gut mischbar sind. Amylalkohol ist mit Wasser zwar nicht mehr mischbar, doch liegt sein Siedepunkt bereits über 100^o, sodass das Abdestillieren zur Gewinnung des Morphins bei vermindertem Druck geschehen müsste, um eine oxydative Zersetzung des Morphins zu vermeiden.

In Aether, Benzin, Benzol, Trichloräthylen, Tetrachlorkohlenstoff und Aethylendichlorid ist das Morphin relativ schwer löslich, während die Nebenalkaloide darin relativ gut löslich sind. Diese Lösungsmittel sind daher für eine Abtrennung der Nebenalkaloide vom Morphin geeignet. Auf dieser Möglichkeit basieren die Benzolmethoden, bei welchen die Nebenalkaloide mit Benzol entfernt werden. Benzol hat als Ausschüttelungsmittel den Nachteil, dass es mit wässrigen Opiumauszügen leicht Emulsionen gibt, die sich oft nur sehr schwer trennen lassen. Eder und Wäckerlin (33) verwenden zum Ausschütteln der Nebenalkaloide aus dem Kalkauszug eine Mischung von Benzol/Tetrachlorkohlenstoff 1:1. Dieses Gemisch neigt weniger zu Emulsionsbildung und hat reinem Benzol gegenüber den Vorteil, dass es nach dem Ausschütteln wässriger Lösungen im Scheidetrichter die untere Phase bildet und bequem abgelassen werden kann.

Während, wie aus Tabelle 2 ersichtlich ist, Morphin in Chloroform oder Benzol schlecht löslich ist, eignen sich diese Lösungsmittel in Mischungen mit aliphatischen Alkoholen sehr gut zum Ausschütteln von Morphin aus schwach alkalischen Lösungen. Am besten haben sich dazu Gemische von Chloroform mit Aethanol oder Isopropanol bewährt. Baggesgaard-Rasmussen und Reimers (14) bestimmten die Löslichkeit des Morphins in Gemischen von absolutem Aethanol (99,35 %) und Chloroform des Handels, sowie von Isopropanol und alkoholfreiem Chloroform. Bei Gemischen mit wasserhaltigem Aethanol ist die Löslichkeit entsprechend Tabelle 3 wesentlich geringer. In Gemischen von (alkoholhaltigem) Handels-Chloroform und Isopropanol ist die Löslichkeit des Morphins entsprechend grösser.

Tabelle 4 Löslichkeit der Morphin-Base in Handels-Chloroform/Aethanol

Gew. %		g Morphinbase/ 100 g Gemisch
Aethanol 99,35 %	Handels- chloroform	
100	0	1,162
80	20	1,320
60	40	1,732
50	50	2,014
40	60	2,217
35	65	2,237
30	70	2,235
20	80	1,889
10	90	0,994
0	100	0,021

Tabelle 5 Löslichkeit der Morphin-Base in Chloroform/Isopropanol

Gew. %		g Morphinbase/ 100 g Gemisch
Isopropanol	Chloroform alkoholfrei	
100	0	0,207
75	25	0,370
50	50	0,571
35	65	0,646
25	75	0,558
15	85	0,385
0	100	0,011

Obwohl bei Chloroform/Isopropanol-Gemischen die grösste Löslichkeit des Morphins bei 35 Gew.% Isopropanol erreicht wird, empfehlen Baggesgaard-Rasmussen und Reimers (14) zum Ausschütteln ein Gemisch mit nur 15 Gew.% Isopropanol, entsprechend 3 Vol.T. Chloroform und 1 Vol.T. Isopropanol, weil bei dem höheren Gehalt an Isopropanol fast doppelt so viel von dem organischen Lösungsmittelgemisch in die wässrige Phase übergeht (22 % gegenüber 12-15 %).

Benzol eignet sich in Gemischen mit aliphatischen Alkoholen ebenfalls zum Ausschütteln des Morphins aus wässrigen Lösungen. Baggesgaard-Rasmussen und Jespersen (13) verwenden Benzol/Isopropanol 3:7 und Küssner (63) Benzol/Butanol 1:1. 1 g Morphinbase löst sich in 360 ml dieser Mischung. Durch Zusatz von 5-10 % Kresol wird die Löslichkeit des Morphins nahezu verdoppelt. Der Verteilungskoeffizient für eine ca. 1 proz. Morphinlösung als wässrige Phase und Kresol/Benzol/Butanol 10:45:45 beträgt 95/5, ohne Kresolzusatz 90/10 (49). Zum Ausschütteln des Morphins aus wässriger Phase wurden noch folgende Gemische vorgeschlagen: Amylalkohol/Chloroform 1:3 (78), Isobutanol/Chloroform 1:4 (40), Benzylalkohol/Chloroform 2:3 (29). Aus Chloroform kann das Morphin mit verd. Dichloressigsäure ausgeschüttelt werden. Die Nebenalkaloide werden dabei vom Chloroform zurückgehalten (92). Aus stark salzsaurer Lösung kann das Morphin mit Chloroform/Phenol 4:1 als Hydrochlorid ausgeschüttelt werden (57). Als Schema für die Trennung des Morphins von den Nebenalkaloiden durch Ausschütteln sei die Methode zur Bestimmung des Morphins im Opial nach der Ph.Helv.V. in ihren Grundzügen angeführt:

Die Lösung des Alkaloidgemisches wird mit Natronlauge alkalisch gemacht, wodurch die Nebenalkaloide als Basen ausfallen, während das Morphin seines Phenolcharakters wegen als Phenolat in Lösung geht. Die ausgeschiedenen Nebenalkaloide werden mit Chloroform/Isopropanol 3:1 ausgeschüttelt und können in ihrer Gesamtheit bestimmt werden. Durch Zusatz von Ammonchlorid wird die alkalische wässrige Phase auf den isoelektrischen Punkt des Morphins gepuffert und dieses kann nun seinerseits mit Chloroform/Isopropanol 3:1 ausgeschüttelt werden. Das Lösungsmittel wird abdestilliert und das Morphin im Rückstand titrimetrisch bestimmt.

Dieser Trennungsgang bildet die Grundlage für die meisten Ausschüttelungsmethoden zur Bestimmung des Morphins im Opium. Die saubere Abtrennung wird in diesem Falle allerdings durch die vielen im Opiumauszug vorhandenen Begleitstoffe erschwert, welche z.T. mit dem Morphin ausgeschüttelt werden. Das durch Ausschütteln isolierte Morphin muss deshalb für die meisten Bestimmungsmethoden noch durch eine weitere Operation, meistens eine Umfällung, gereinigt werden.

2123 Abtrennung der Hauptmenge an Begleitstoffen durch chromatographische Verfahren

Bei der Bestimmung der Wirkstoffe in kompliziert zusammengesetzten Naturprodukten bietet in den meisten Fällen die Abtrennung der zu bestimmenden Stoffe die grösste Schwierigkeit. Wenn man bedenkt, dass im Opium rund 25 Alkaloide und daneben eine grosse Menge anderer Substanzen wie Fette, Harze, Farbstoffe usw. vorhanden sind, dann wird man erkennen, dass dies auch bei der Bestimmung des Morphins oder anderer Alkaloide im Opium der Fall ist. Mit den bisher erwähnten Methoden, fraktionierte Ausfällung und systematische Ausschüttelung, kommt man im Falle der Morphinbestimmung wohl zum Ziel, doch sind die Verfahren meistens sehr langwierig und ohne befriedigende Trennschärfe. Eine wesentliche Erleichterung brachte die Wiederentdeckung und der Ausbau der Tswett'schen Adsorptionschromatographie, sowie die in der Folge entwickelten neueren chromatographischen Verfahren, wie Säulenverteilungschromatographie, Ionenaustauschchromatographie und Papierchromatographie. In Anwendung dieser Verfahren auf die Morphinbestimmung im Opium wurde zuerst versucht, Ballaststoffe, besonders die aus dem Opium mitextrahierten Farbstoffe und die Kristallisation des Morphins hemmende Substanzen, chromatographisch abzutrennen. Eder und Wäckerlin (33) filtrierten die organische Morphinausschüttelung durch ein Adsorptionsfilter aus Aluminiumoxyd, Klee und Kirch (56) perkolierten den methanolischen Opiumauszug zur Reinigung durch eine Säule mit Florisil. Svendsen und Aarnes (101) sowie Garratt und Mitarb. (37) kombinierten die chromatographische Reinigung des Opiumauszuges mit der Extraktion des Opiums, indem sie dieses mit Aluminiumoxyd verrieben und dem Gemisch die Alkaloide durch Perkolation mit Chloroform/Isopropanol 3:1 entzogen. Ein Teil der sonst löslichen nichtalkaloidischen Begleitstoffe wird vom Aluminiumoxyd zurückgehalten. Böhme und Strohecker (20) untersuchten das Verhalten der Opiumalkaloide auf Aluminiumoxydsäulen. Das Morphin unterscheidet sich dabei in seinem Verhalten von dem der Nebenalkaloide, sodass die Autoren eine chromatographische Methode zur Bestimmung des Morphins ausarbeiten konnten (21). Die etwas langwierige Methode wurde von Fischer und Folberth (36) ganz wesentlich vereinfacht.

Aluminiumoxyd ist ein kräftiges Adsorptionsmittel und ein amphotärer Ionenaustauscher zugleich. Je nach dem angewandten System überwiegt die eine oder andere Eigenschaft. In hydroxylfreien Lösungsmitteln überwiegt der Adsorptionseffekt, während im wässrigen Milieu die Austauschereigenschaften in den Vordergrund treten.

Übersichtlichere Verhältnisse erlauben synthetische Ionenaustauscher, in Wasser und organischen Lösungsmitteln unlösliche Hochpolymere, meist auf Acryl- oder Styrolbasis, mit sauren (Kationenaustauscher) oder alkalischen Gruppen (Anionenaustauscher). Das Morphin kann auf Grund seines Basencharakters von neutralen und sauren Begleitstoffen durch geeignete Kationenaustauscher getrennt werden. Wegen seiner phenolischen Hydroxylgruppe wird es von starken Anionenaustauschern fixiert und kann so von nichtphenolischen Substanzen getrennt werden. Eine grosse Anzahl solcher synthetisch hergestellter Ionenaustauscher wurden auf ihre Eignung zur Trennung der Opiumalkaloide hin untersucht und auf Grund der Befunde Methoden zur Bestimmung des Morphins im Opium mit Hilfe von Ionenaustauschern vorgeschlagen (1,22,35,44,47,55, 56,72).

In wohl vollkommenster Weise gelingt die Abtrennung des Morphins von den übrigen Opiumbestandteilen durch das papierchromatographische Verfahren. Die Trennung der Opiumalkaloide wurde von zahlreichen Forschern versucht und eine Vielzahl von Systemen ist dazu vorgeschlagen worden (88).

2124 Abtrennung der Hauptmenge an Begleitstoffen durch Elektrophorese

Das Prinzip der Trennung von Substanzgemischen auf Grund ihrer verschiedenen Wanderungsgeschwindigkeit in einem elektrischen Feld wurde ebenfalls auf die Abtrennung der Begleitstoffe, bzw. die Isolierung des Morphins aus dem Opium angewandt. Die Papierelektrophorese erreicht aber auf Grund der ähnlichen Wanderungsgeschwindigkeiten von Morphin, Kodein und Thebain sowie anderer Opiumbestandteile nicht die Leistungsfähigkeit der Papierchromatographie. Mit der Papierelektrophorese von Opiumauszügen beschäftigten sich Farmilo und Mitarb. (34). Swendsen und Bergane (102) sowie Graf und List (42) verwendeten die Papierelektrophorese zur quantitativen Bestimmung des Morphins im Opium.

213 Isolierung des Morphins

Die im vorhergehenden Kapitel beschriebenen Methoden zur Abtrennung der Begleitstoffe vom Morphin entfernen in den meisten Fällen wohl die Hauptmenge der alkaloidischen und nichtalkaloidischen Begleitstoffe, lassen jedoch, abgesehen von der

papierchromatographischen Methode, in keinem Falle das Morphin in so reinem Zustande zurück, dass es durch Wägung oder sonstwie direkt bestimmt werden könnte. Um dies zu erreichen, muss es noch als Base oder als schwerlösliches Derivat aus der noch Begleitstoffe enthaltenden Lösung ausgefällt werden. Eine Ausnahme hievon bilden die photometrischen und polarographischen Methoden, bei welchen das Morphin nicht zuerst in reinem Zustand übergeführt werden sondern seine Lösung nur von bestimmten störenden Begleitstoffen befreit werden muss.

2131 Isolierung des Morphins durch Ausfällen als Base

Die Löslichkeit der Morphinbase ist stark von der Azidität der Lösung abhängig und hat ihr Minimum beim isoelektrischen Punkt des Morphins, der von Kolthoff (62) bzw. Baggesgaard-Rasmussen und Reimers (14) in guter Uebereinstimmung bei pH 8,96 bzw. 8,89 angegeben wird.

Tabelle 6 Löslichkeit der Morphinbase bei verschiedenem pH

pH	6,8	7,0	7,5	8,0	8,5	9,0	9,5	10,3
mM/lit	10,0	7,0	2,0	1,1	0,68	0,51	0,9	2,0

Die höchsten und die niedrigsten Grenzwerte für den pH-Wert, bei welchem das Morphin noch so vollständig ausgefällt wird, dass die Fällung zur quantitativen Bestimmung anwendbar ist, betragen nach Untersuchungen von Kolthoff (62) und Eder (31) ca. 8,8 - 9,7. Gegen die Ueberschreitung dieser Grenzwerte sucht man sich durch Verwendung geeigneter Puffergemische zu schützen. Bei den neueren Kalkmethoden wird das Morphin durchwegs durch Pufferung des Opiumauszuges mit Ammoniak/Ammonchlorid gefällt. Der dabei in der Mutterlauge sich einstellende pH-Wert ist ziemlich konstant, wenn er auch durch die Azidität und die Pufferwirkung des Opiums selbst gewisse Schwankungen zeigt. Jedenfalls wird der optimale pH-Bereich mit viel grösserer Sicherheit erreicht, als bei der Helfenberger-Methode, wo die Pufferung durch Zusatz von Ammoniak allein erfolgt.

Ausser vom pH-Wert wird die Fällung des Morphins noch von den im Opiumauszug vorhandenen fällungshemmenden Substanzen beeinflusst. In extremen Fällen können sie verhindern, dass das Morphin überhaupt auskristallisiert, jedenfalls bestimmen sie neben dem pH-Wert und der Temperatur während der Fällung die in der Mutterlauge verbleibende Morphinmenge. Diese ist durchschnittlich grösser als nach Versuchen mit

reinen Alkaloiden zu erwarten ist. Die Morphinbestimmungsmethoden, welche die Fällung des Morphins aus dem Opiumauszug selbst vornehmen lassen, erfassen daher das Morphin nicht vollständig und es ist auch nicht möglich, durch Angabe eines Korrekturfaktors den durch Kristallisationshemmung und unterschiedliche Wasserstoffionenkonzentration der Mutterlauge bedingten Verlust auszugleichen. Bei den officinellen Kalkmethoden erhöht dieser Korrekturfaktor das Bestimmungsergebnis um 10 % und übersteigt damit sicher die für eine solche Korrektur tolerierbare Grenze.

Einen wesentlichen Fortschritt brachten die Methoden, bei welchen das Morphin nicht im Opiumauszug selbst gefällt, sondern durch Ausschütteln aus ihm herausgenommen, von den fällungshemmenden Substanzen möglichst vollständig befreit und in einem genau definierten Milieu zur Kristallisation gebracht wird. Die in der Mutterlauge verbleibende Morphinmenge ist nun nur noch von der Temperatur bei der Fällung abhängig, sodass sie eher durch einen Faktor ausgeglichen werden kann (33).

2132 Isolierung des Morphins in Form eines Derivates

Von den zahlreichen Alkaloidfällungsmitteln hat sich keines zur Isolierung des Morphins aus Opiumauszügen bewährt. Sie sind meistens nicht spezifisch und fallen neben den Alkaloiden noch andere Körper (Eiweiss usw.) oder das Morphin nur gemeinsam mit den anderen Opiumalkaloiden. Es war Mannich (71) vorbehalten, im 1-Chlor-2,4-dinitrobenzol ein für Morphin spezifisches Reagens zu finden, mit dessen Hilfe es möglich ist, das Morphin aus einem nur wenig vorgereinigten Opiumauszug als Dinitrophenyläther in reiner Form zu isolieren. Diese Methode wird bei den gravimetrischen Bestimmungsmethoden eingehender besprochen.

214 Bestimmung des Morphins

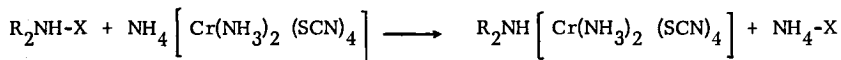
2141 Gravimetrische Bestimmung

Für die gravimetrische Bestimmung des Morphins werden heute folgende Methoden angewendet:

21411 Fällung mit Reinecke-Salz

Organische Basen, darunter die Alkaloide, können mit Reinecke-Salz, dem Ammonsalz der Tetrarhodanato-diamin-chrominsäure, als in schwach saurem wässrigem

Milieu schwerlösliche Salze gefällt werden. Die Reaktion kann durch folgende Gleichung wiedergegeben werden:



Die quantitative Ausfällung ist bereits nach 1/2 Stunde beendet, sodass eine Bestimmung in kürzester Zeit durchgeführt werden kann. Da die übrigen Opiumalkaloide unter denselben Bedingungen wie das Morphin als schwerlösliche Salze ausfallen, ergibt sich die Notwendigkeit, die Nebenalkaloide vor der Fällung des Morphins quantitativ abzutrennen. Die optimalen Fällungsbedingungen für Morphin und die übrigen Opiumalkaloide wurden von Böhme und Lampe (19) festgestellt und die Methode von Böhme und Strohecker (21) zur Bestimmung des aus Opium chromatographisch isolierten Morphins verwendet. Statt durch Wägung können die Reineckate auch kolorimetrisch bestimmt werden, indem sie in Azeton gelöst werden und die Farbintensität der Lösung gemessen wird (18, 65). Nach Hydrolyse mit alkalischer Seignettesalzlösung kann der Rhodananteil durch argentometrische Titration bestimmt werden (s.S.65).

21412 Fällung mit Kalignost bzw. Cäsignost

Aehnlich wie mit Reinecke-Salz können organische Basen, darunter die Alkaloide mit Kalignost (Tetraphenyl-bornatrium) bzw. Cäsignost (Triphenyl-cyanobornatrium) aus essigsaurer Lösung quantitativ gefällt werden (2, 89, 90, 91). Diese Methoden werden zur Bestimmung des Morphins und der wichtigeren Nebenalkaloide verwendet, dienen jedoch bis jetzt noch nicht zur Bestimmung des Morphins im Opium.

21413 Fällung mit 1-Chlor-2,4-dinitrobenzol

Die Umsetzung des Morphins mit Chlordinitrobenzol wurde erstmals von Mannich (70) für die quantitative Bestimmung des Morphins verwendet. Chlordinitrobenzol reagiert mit der phenolischen Hydroxylgruppe des Morphins unter Aetherbildung, nicht aber mit den nichtphenolischen Nebenalkaloiden, weshalb diese vor der Morphinbestimmung nicht abgetrennt werden müssen. Ausser durch die Spezifität für Morphin zeichnet sich die Methode durch die hohe Kristallisationsfähigkeit und geringe Löslichkeit des Reaktionsproduktes aus. Die durch Einführung des Dinitrophenylrestes bewirkte Molekülvergrößerung des Morphins um mehr als die Hälfte ist für die Genauigkeit der Methode sehr günstig (Molgewicht des Morphins 285, Molgewicht des Morphin-dinitrophenyläthers 451). Awe und Reinecke (10) sowie Dann und Wippert (27)

haben an Stelle des Chlordinitrobenzol das analoge Fluordinitrobenzol vorgeschlagen, da infolge der grösseren Reaktionsfähigkeit des letzteren die Bildung des Morphinäthers in wesentlich kürzerer Zeit vollständig ist.

2412 Titrimetrische Bestimmung

Das in Basenform aus Opium abgeschiedene Morphin wird fast durchwegs durch direkte oder indirekte alkalimetrische Titration bestimmt. Im einen Falle wird das Morphin in Alkohol, meist Methanol, gelöst und mit Säure titriert, im anderen Falle wird es in überschüssiger Säure gelöst und der Säureüberschuss mit Lauge zurücktitriert. Theoretisch soll eine Base auf den pH-Wert titriert werden, den eine Lösung ihres Salzes von der entsprechenden Konzentration besitzt. Der pH-Wert reiner Morphinhydrochloridlösungen wurde von Reimers (86) mit 5,0 - 5,3 bestimmt. Als geeigneter Indikator hat sich deshalb Methylrot bewährt (pH 4,4 - 6,2). Gegen Ende der Titration muss die alkoholische Lösung mit frisch ausgekochtem und wieder erkaltetem Wasser verdünnt werden. Die Verdünnung mit Wasser ist nötig, weil die Titrationslösung nicht mehr als 25 % Aethanol und 40 % Methanol enthalten soll, da der Umschlag des Methylrots sonst unscharf und zu früh eintreten würde. Der Zusatz von Wasser geschieht erst gegen Ende der Titration, wenn die Hauptmenge des Morphins schon in das wasserlösliche Chlorhydrat überführt worden ist, wodurch ein Ausfallen von Morphinbase verhindert wird. Eine Verunreinigung des Morphins mit Kodein oder Narkotin bewirkt bei der Titration trotz der gegenüber Morphin unterschiedlichen Basizität dieser Alkaloide zu hohe Morphinwerte. Narzein hat wegen seiner geringen Basizität keinen Einfluss. In neuerer Zeit sind eine Reihe von neuen Titrationsmethoden entwickelt worden und zum Teil auf die Bestimmung des Morphins angewendet worden (54). Sie erfordern jedoch meistens polarimetrische oder elektrometrische Endpunktsbestimmung und fanden bis jetzt noch keine allgemeine Anwendung auf die Opiumanalyse.

2413 Kolorimetrische und spektrophotometrische Bestimmung

Von den zahlreichen bekannten Farbreaktionen des Morphins sind nur wenige für eine quantitative Bestimmung von Morphin auch in Gegenwart der Nebenalkaloide geeignet.

24131 Nitrosoreaktion

Morphin bildet in saurer Lösung mit Nitrit eine gelbe Farbe, welche auf Zusatz von Ammoniak in orange-rot umschlägt. Diese auf der Bildung von 2-Nitrosomorphin beruhende Reaktion wurde erstmals von Goin (39) für die quantitative Bestimmung des Morphins im Opium benutzt. Die Zuverlässigkeit der Farbbildung für die quantitative Auswertung wurde von van Arkel (5) bestätigt und die Methode in der Folge von mehreren Autoren (42, 55, 80, 99, 100, 102) auf die Bestimmung des Morphins im Opium angewandt.

24132 Diazoreaktion

Morphin und seine Salze lassen sich in alkalischer Lösung mit Diazoniumverbindungen zu Farbstoffen kuppeln. Diese Eigenschaft ist die Grundlage der von Lautenschläger (64) vorgeschlagenen und in der Folge wiederholt modifizierten (80) Morphinbestimmungsmethode. Nach Balak und Jindra (16) sollen sich zur Kupplung besonders m- und p-Nitranilin eignen.

24133 Jodsäurereaktion

Wird eine Morphinsalzlösung mit Jodsäure versetzt, so wird Morphin zu Oxymorphin oxydiert und die Jodsäure zu Jod reduziert, wobei sich die Lösung infolge Bildung von Jodverbindungen gelb färbt. Diese Reaktion wurde erstmals von Georges und Gascard (38) für die Morphinbestimmung und später von Heiduschka und Faul (48) für die Bestimmung des Morphins in Mohnkapseln verwendet. Von Mariani, Guarino und Marelli (73) wurde die Reaktion zu einem Bestimmungsverfahren des Morphins in Opium ausgearbeitet, wobei die Spezifität der Reaktion für Morphin durch eine zweite Farbbildung mit Ferrichlorid vergrößert wurde. Cramer und Voermann (26) schlagen statt Ferrichlorid Nickelsulfat und Pride und Stern (85) Nickelchlorid vor. In dieser letzten Modifikation wurde die Jodsäurereaktion von Brochmann-Hansen (22) zur Bestimmung des Morphins in Opium verwendet.

24134 Folin-Ciocalteu-Reaktion

Morphin gibt mit Folin-Ciocalteu-Reagens (Natrium-Wolfram-Molybdat) in alkalischer Lösung eine Blaufärbung. Die Reaktion beruht auf der phenolischen Hydroxylgruppe des Morphins, weshalb die nichtphenolischen Nebenalkaloide nicht stören. Klee und Kirch (56) bestimmten mit dieser Farbreaktion das Morphin im Opium.

Dyer und McBay (30) beschreiben die direkte spektrophotometrische Bestimmung des Morphins und der wichtigeren übrigen Opiumalkaloide im ultravioletten Licht. Dem aus Opium isolierten Morphin haften aber immer noch so viele Verunreinigungen an, dass eine Bestimmung mit Wellenlängen unter 300 m u bis jetzt nicht möglich war.

2144 Polarographische Bestimmung

Morphin ist an sich polarographisch nicht reduzierbar, doch kann es nach Ueberführung in 2-Nitrosomorphin mittels Polarographie bestimmt werden. Der Vorteil des Verfahrens besteht darin, dass die Bestimmung in Gegenwart der Nebenalkaloide erfolgen kann, da diese keine Nitrosoverbindung bilden. Baggesgaard-Rasmussen, Hahn und Ilver (11), Holubek (50) sowie Pfeifer und Keller (82) beschreiben die polarographische Morphinbestimmung im Mohnstroh bzw. in Mohnkapseln.

2145 Papierchromatographische Bestimmung

Die quantitative Auswertung der papierchromatographisch getrennten Substanzen kann entweder direkt auf dem Papier oder nach dem Eluieren derselben vom Papier durchgeführt werden. Svendsen (99) sowie Svendsen und Bergane (102) chromatographierten Opiumauszüge, eluierten das Morphin vom Papierchromatogramm und bestimmten es kolorimetrisch mit Hilfe der Nitrosoreaktion. Svendsen, Aarnes und Paulsen (100), Asahina und Ono (6, 8) sowie Miram und Pfeifer (75) bestimmten das Morphin direkt auf dem Papierchromatogramm durch photometrische Auswertung des Morphinflecken.

221 Bereitstellung des Untersuchungsmaterials

2211 Reinheitsprüfung und Gehaltsbestimmung der wichtigsten Opiumalkaloide

Die Methoden zur Bestimmung des Morphins und der wichtigsten Nebenalkaloide im Opium wurden durch das Verhalten von reinen Alkaloiden bei den Bestimmungen überprüft. Die Identität und Reinheit der zu diesem Zwecke verwendeten Alkaloidbasen wurden mit Hilfe der Schwefelsäureprobe, der Schmelzpunktsbestimmung nach Kofler (61) und der Papierchromatographie nach Büchi und Schumacher (24) festgestellt. Der Gehalt der Alkaloide wurde durch wasserfreie Titration nach Levi, Oestreicher und Farmilo (67) ermittelt. Die stärkeren Basen wurden zudem durch Titration mit 0,1 n-Salzsäure in wässrig-alkoholischem Medium gegen Methylrot bestimmt. Der Wassergehalt der Alkaloide wurde durch den Gewichtsverlust beim Trocknen und durch Titration nach Karl-Fischer (Ph.Helv.V., Suppl. III) festgestellt.

Tabelle 7 Identitäts- und Reinheitsprüfung der Opiumalkaloide

Alkaloidbase	Schwefelsäureprobe	Schmelzpunkt	Eutektische Temperatur	Rf-Wert*
Morphin	Forderung: farblos	254 ⁰ (Zers.)	174 ⁰ mit Dicyandiamid	0,03
	gefunden: farblos	254 ⁰	174 ⁰	0,03
Kodein	Forderung: farblos	156 ⁰	117 ⁰ mit Phenazetin	0,09
	gefunden: farblos	156 ⁰	117 ⁰	0,09
Thebain	Forderung: braunrot	193 ⁰	186 ⁰ mit Dicyandiamid	0,39
	gefunden: braunrot	193 ⁰	186 ⁰	0,4
Narkotin	Forderung: gelbrot	174 ⁰	131 ⁰ mit Phenazetin	0,86
	gefunden: gelbrot	174 ⁰	131 ⁰	0,9
Papaverin	Forderung: violett	146 ⁰	122 ⁰ mit Benzanilid	0,76
	gefunden: violett	145 ⁰	121,5 ⁰	0,8
Narzein	Forderung: braun	145-165 ⁰	126 ⁰ mit Benzanilid	0,47
	gefunden: braun	147-161 ⁰	126 ⁰	0,5

* Nach Büchi und Schumacher (24)

Mobile Phase: Toluol/Isobutanol 1:1, wassergesättigt, Whatmann-Papier Nr. 1, pH 3,5 (Kolthoff-Puffer), absteigend.

Tabelle 8 Gehaltsbestimmung der Opiumalkaloide

Alkaloidbase	Gewichtsverlust bei 103 - 105° %	Wassergehalt nach Karl Fischer %	Titration mit	
			Perchlor- säure %	Salz- säure %
Morphin-Monohydrat	6,0	6,0	100,0	99,9
Kodein-Monohydrat	4,7	4,7	99,8	99,8
Thebain	0,3	--	99,7	99,8
Papaverin	--	--	99,9	
Narkotin	--		100,0	
Narzein-Trihydrat	6,9	6,6	99,5	

2212 Die Opiummuster

Unsere Versuche führten wir mit folgenden Opiummustern durch:

Opium I	Benares
Opium II	Türkei
Opium III	Iran
Opium IV	Jugoslavien

Die Opiummuster I, III und IV stammen von den seinerzeit vom Völkerbund an verschiedene Laboratorien zur Ausarbeitung einer Morphinbestimmungsmethode versandten Mustern. Sie waren in mit paraffiniertem Kork verschlossenen Glasflaschen zu 30 g abgefüllt. Diese Opiummuster standen in unserem Institut bereits für die Untersuchungen von Eder und Wäckerlin (32, 33) sowie zur Ausarbeitung der Dissertation von Brunner (23) zur Verfügung. Bei unserer Ueberprüfung konnte festgestellt werden, dass gegenüber früheren Bestimmungen (32) der Feuchtigkeitsgehalt zu- und der Morphingehalt abgenommen hatte.

Feuchtigkeitsgehalt der Opiummuster

Opiummuster	Bestimmung 1937 (32)	Unsere Bestimmung
Opium I	2,5 %	5,7 %
Opium II	-	6,2 %
Opium III	3,7 %	4,9 %
Opium IV	2,8 %	5,2 %

222 Ueberprüfung der Methoden zur Bestimmung des Morphins im Opium

2221 Die Pharmakopoe-Methoden

Gemäss ihrem Arbeitsprinzip lassen sich die Pharmakopoe-Methoden in drei Gruppen einteilen:

22211 Ammoniak-Methode

Deutsches Arzneibuch VI 1926

22212 Kalk-Methode

- | | | |
|----|--|------|
| a) | Pharmacopoea Helvetica V | 1933 |
| | Pharmacopée Belge IV | 1940 |
| | Egyptian Pharmacopoeia | 1953 |
| | Pharmakopoe der USSR VIII | |
| b) | The British Pharmacopoeia | 1958 |
| | Türk Kodeksi | 1940 |
| | Farmacopea Ufficiale del Regno d'Italia VI | 1940 |
| | Pharmacopoea Jugoslavica II | 1951 |
| c) | Pharmacopoea Internationalis I | 1955 |
| | Pharmacopoea Danica IX | 1948 |
| | Codex Medicamentarius Gallicus 7 | 1949 |
| d) | The Pharmacopoeia of the United States of America XV | 1955 |

22213 Mannich-Methode

Svenska Farmakopén XI Suppl. 1 1946

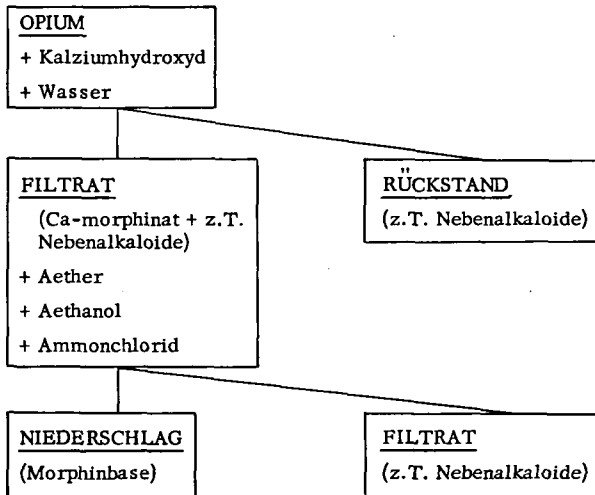
22211 Ammoniak-Methode

Nach einer Aufstellung von Gränic her (43) liessen im Jahre 1936 noch 20 von insgesamt 32 angeführten Pharmakopoe-Methoden das Morphin im Opium durch Ammoniak-Methoden bestimmen. Im Zuge der Ausarbeitung neuer Arzneibücher wurde dieses Verfahren aber durchwegs aufgegeben und gilt wegen der ihm anhaftenden Mängel heute als veraltet. Von einer Ueberprüfung dieser Methode haben wir daher abgesehen.

22212 Kalk-Methode

Den offiziellen Kalkmethoden ist die Extraktion des Opiums durch einfache Mazeration mit Kalkwasser und die Fällung des Morphins direkt aus dem Kalkauszug mit Ammonchlorid gemeinsam. Eine Ausnahme hiervon macht die USP XV, welche das Opium mit reinem Wasser extrahieren lässt. Durch die einmalige Behandlung des Opiums mit Kalziumhydroxyd und Wasser streben die Kalkmethoden einen konzentrierten Opiumauszug an, um bei der Fällung die in der Mutterlauge verbleibende Morphinmenge möglichst gering zu halten. Da ein Teil der zur Extraktion angewandten Flüssigkeitsmenge vom Opiummark festgehalten wird, ist es nicht möglich, den gesamten Auszug zur Weiterverarbeitung zu erhalten, weshalb das Morphin nur in einem aliquoten Teil desselben bestimmt werden kann.

Schema der Kalkmethoden



Die Ph. Helv. V. und die ihr bezüglich der Morphinbestimmung entsprechenden Arzneibücher der Gruppe a berücksichtigen die Volumenzunahme des Opiumauszuges durch die Feuchtigkeit und die Extraktstoffe des Opiums insofern, als sie 26 ml Filtrat gleich 25 ml Ausgangsflüssigkeit setzen. Da die Feuchtigkeit und der Extraktgehalt je nach Opiummuster variieren, ist diese Korrektur, wie unsere Erfahrung zeigte, nur eine angenäherte.

Die Brit. Ph. 1958 und die übrigen Arzneibücher der Gruppe b unterscheiden sich hinsichtlich der Morphinbestimmungsmethode im Prinzip nicht von der Ph.Helv. V. Sie verlangen jedoch mehr Opium für eine Bestimmung (8 g statt 5 g) und korrigieren die Volumenzunahme des Opiumauszuges analog zur Ph.Helv.V. indem sie 52 ml Filtrat gleich 50 ml Ausgangsflüssigkeit setzen. Die relativ unwesentlichen Unterschiede gegenüber der Ph.Helv.V. und der Ph.Int.I. betreffen die Isolierung und die Bestimmung des Morphins (indirekte statt direkte Titration).

Die Ph.Int. I. und die übrigen Arzneibücher der Gruppe c lassen die Feuchtigkeit und den Extraktgehalt für jedes Opiummuster eigens bestimmen, um durch Einbeziehung dieser Werte die Ungenauigkeit durch Entnahme eines nicht genau aliquoten Teils des Auszuges zu vermeiden.

Die U.S.P. XV müsste hinsichtlich der Extraktion zu den Wassermethoden gezählt werden. Da jedoch die Abtrennung der Nebenalkaloide im wässrigen Extrakt mit Kalziumhydroxyd erfolgt und dies das Charakteristicum der Kalkmethoden darstellt, kann sie auch als solche betrachtet werden.

Für die Ueberprüfung der einzelnen Methoden wurden die vier Phasen der Morphinbestimmung:

1. Extraktion des Morphins aus dem Opium
2. Abtrennung der Hauptmenge an Begleitstoffen
3. Isolierung des Morphins
4. Bestimmung des Morphins

für sich einer Ueberprüfung unterzogen.

1. Die Extraktion des Morphins aus dem Opium

Mit Ausnahme der U.S.P. XV erfolgt bei allen officinellen Kalkmethoden die Extraktion durch einfache Mazeration. Die Arbeitsweise der Ph.Helv.V bildete die Grundlage und wurde von mehreren Arzneibüchern direkt (Gruppe a) oder nach geringfügigen Abänderungen (Gruppe b und c) übernommen.

Extraktionsvorschrift der Ph.Helv.V:

5,00 g gepulvertes Opium werden in einer Reibschale mit 10 ml Wasser zu einem gleichmässigen Brei verrieben. Durch weiteres sorgfältiges Verreiben werden 2 g Kalziumhydroxyd und 40 ml Wasser hinzugemischt. Während einer halben Stunde wird öfters umgerührt und die Anreibung sodann durch ein Faltenfilter von 10 cm Durchmesser filtriert. 26,0 ml Filtrat werden entnommen und darin das Morphin bestimmt.

Mit der Ueberprüfung der Extraktion durch einfaches Mazerieren des Opiums mit Wasser und Kalziumhydroxyd beschäftigten sich bereits Eder und Wäckerlin (32). Sie stellten sich zu diesem Zwecke von vier verschiedenen Opiummustern Kalkextrakte im Verhältnis von 1 : 10 her, bestimmten darin nach ihrer Ausschüttelungsmethode (32) den Morphingehalt und verglichen die erhaltenen Werte mit denen, die sie nach Extraktion des Opiums im Verhältnis 1 : 50 erhielten. Die Morphingehalte im konzentrierten Auszug lagen, auf das Ergebnis bezogen, um durchschnittlich 10 % tiefer. Die Autoren verneinen daher die Möglichkeit, durch nur einmaliges Behandeln des Opiums mit der zehnfachen Menge Kalkwasser das Morphin quantitativ zu erhalten. Dazu ist allerdings zu bemerken, dass die nach der Ph.Helv.V erhaltenen Morphinwerte keineswegs um so viel unter denen der Methode Eder-Wäckerlin (32) liegen. Bei den vier untersuchten Opiummustern lagen sie im Gegenteil fast durchwegs darüber (s. Tabelle 10)

Tabelle 10 Morphingehalt in % nach Bestimmungen von Eder und Wäckerlin (32)

Morphingehalt nach	Opium A	Opium B	Opium C	Opium D
Methode Eder-Wäckerlin (32)				
im Extrakt 1 : 10	11,60	15,87	13,27	16,92
im Extrakt 1 : 50	12,37	16,90	14,23	17,73
Methode Ph.Helv.V im Extrakt 1 : 10	12,00	17,24	14,70	18,43

Die Erklärung dafür könnte darin liegen, dass durch die Methode der Ph.Helv.V ein unreineres Morphin zur Bestimmung gebracht wird. Abgesehen von der Richtigkeit dieses Argumentes muss aber doch noch ein weiterer Grund für den Unterschied der Morphinwerte, die Eder und Wäckerlin (32) einerseits nach ihrer Methode und andererseits nach der Methode der Ph.Helv.V erhielten, vorliegen. Die beiden Autoren geben nicht an, wie sie den Extrakt 1 : 10 herstellten. Wahrscheinlich taten sie es in derselben Art und Weise wie den verdünnten Extrakt 1 : 50. In diesem Falle wäre es nun denkbar, dass bei der von der Ph.Helv.V vorgeschriebenen halbstündigen Mazerationsdauer eine grössere Morphinmenge in Lösung geht als bei der Extraktion nach Eder und Wäckerlin (32), während welcher das Lösungsmittel viel weniger lang mit dem Opium in Berührung ist und eine vollständige Extraktion durch wiederholte Anwendung neuer Lösungsmittelmengen erreicht wird. Das Problem läuft somit auf die Frage der Wiederholung und Dauer der Mazeration hinaus.

Die Richtigkeit dieser Vermutung konnte durch Vergleich der Morphingehalte von Opiumauszügen bestätigt werden, welche einerseits durch nur 5 Minuten langes und andererseits durch 30 Minuten dauerndes Mazerieren des Opiums hergestellt wurden. Die Bestimmung erfolgte nach der Vorschrift der Ph.Helv.V, nur dass in dem einen Falle die Mazerationsdauer auf 5 Minuten abgekürzt wurde. In derselben Versuchsreihe haben wir die Mazerationsdauer bei der Analyse eines Opiummusters auf eine bzw. zwei Stunden verlängert. Wie aus Tabelle 11 ersichtlich ist, liess sich dadurch der Morphingehalt nicht weiter erhöhen; nach zweistündiger Mazeration sank er im Gegenteil leicht ab. Den Grund dafür sehen wir in einer zunehmenden oxydativen Zersetzung des Morphins beim langen Stehen in alkalischer Lösung. Dies steht in Uebereinstimmung mit den Ergebnissen der Untersuchungen von Dietzel und Huss (28), welche zeigten, dass Morphin in neutraler und besonders in alkalischer Lösung beim Stehen an der Luft zu Oxydimorphin oxydiert wird.

Tabelle 11 Morphingehalt in % nach verschieden langer Mazerationsdauer

	Mazerationsdauer in Minuten			
	5	30	60	120
Opium I	9,85	10,15	10,18	10,07
Opium II	14,04	14,46		
Opium III	10,43	10,88		

Im Falle der Ph.Helv.V - Vorschrift ist die Frage nach der quantitativen Extraktion verbunden mit der Frage, ob 26 ml Filtrat tatsächlich die Hälfte des im Opium vorhandenen Morphins enthalten. Im Falle der Vorschrift nach der Brit.Ph.1958 ist die Fragestellung mit anderen Zahlenwerten dieselbe. Wenn die aliquote Menge von 26 ml Filtrat tatsächlich die Hälfte des im Opium vorhandenen Morphins enthalten, dann müsste im Opiumrückstand und im Rest des ersten Filtrates noch einmal dieselbe Morphingehalt gefunden werden können. Ausgehend von dieser Ueberlegung haben wir verschiedene Opiummuster entsprechend der Vorschrift der Ph.Helv.V extrahiert, 26 ml Filtrat entnommen und darin das Morphin in weiter unten angegebener Weise bestimmt. Der Opiumrückstand wurde sodann weiter extrahiert, das zweite Filtrat mit dem Rest des ersten vereinigt und auch darin das Morphin bestimmt. Die Bestimmungen wurden wie folgt durchgeführt:

5,000 g Opium wurden nach der Vorschrift der Ph.Helv.V mit 50,0 ml Wasser und 2 g Kalziumhydroxyd eine halbe Stunde lang mazeriert. Die Mischung wurde in eine Glassinternutsche 17 G4 überführt, welche derart auf einem 250 ml Masskolben aufgesetzt war, dass das Filtrat bei schwachem Unterdruck direkt dort hinein gesaugt werden konnte. Von diesem ersten Filtrat wurden 26,0 ml entnommen und in einem 50 ml Masskolben bis zur Marke mit Wasser verdünnt (= Filtrat I).

Der im Filter verbliebene Opiumrückstand wurde weiter extrahiert, indem wir ihn mit 30 ml Wasser zu einem dünnen Brei anschlammten, absaugten und wieder mit 30 ml Wasser anschlammten und diese Operation so oft wiederholten, bis 250,0 ml Filtrat erhalten war (= Filtrat II).

20 ml des Filtrates I (= 1,00 g Opium) wurde durch Zugabe von n-Salzsäure auf pH 4-5 gebracht und durch eine Säule von 10 g Aluminiumoxyd "Woelm sauer" in einem Allihnschen Rohr 15a G3 geleitet. Die Säule wurde mit 30 ml Wasser in Portionen von je 10 ml nachgewaschen. Der auf diese Weise chromatographisch von der Hauptmenge an Ballaststoffen befreite Opiumauszug wurde ammoniakalisch gemacht und mit 60 ml Chloriso (Chloroform/Isopropanol 3:1) eine Minute lang geschüttelt. Die organische Phase wurde durch ein mit Chloriso befeuchtetes Papierfilter in einen 250 ml Rundkolben filtriert. Das Ausschütteln wurde in gleicher Weise mit 50 und 40 ml Chloriso wiederholt und die Ausschüttelungen durch dasselbe Filter in den Rundkolben filtriert. Das Filter wurde mit 10 ml Chloriso gewaschen und das Lösungsmittel im Rundkolben abdestilliert. Der Rückstand wurde im Vakuum von noch anhaftendem Lösungsmittel befreit und sodann in 30 ml Azeton gelöst. Zur Lösung wurde 0,25 g 1-Chlor-2,4-dinitrobenzol, 4 ml 25 proz. Ammoniak und 36 ml Wasser zugesetzt. Der Kolben wurde verschlossen und über Nacht bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Darauf wurde er noch eine halbe Stunde in den Kühlschrank gestellt und der Niederschlag sodann in einem Glassinteriegel G3 gesammelt und nach viermaligem Waschen mit je 2 ml Azeton im Trockenschrank bei 80° getrocknet und gewogen. Das Gewicht des Morphindinitrophenyläthers ergibt, mit 0,63 multipliziert, den Prozentgehalt des Opiums an Morphin.

100,0 ml des Filtrates II (= 1,00 g Opium) wurden nach Ansäuern mit n-Salzsäure (pH 4-5) unter vermindertem Druck und mässiger Wärme auf ca. 20 ml eingedampft und darin wie eben beschrieben nach chromatographischer Reinigung das Morphin bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 12 zusammengestellt.

Dieses Verfahren: Kalkextraktion, Ansäuern und chromatographische Reinigung des Kalkauszuges mit Aluminiumoxyd, Ausschütteln der Alkaloide mit Chloriso und Fällung des Morphins als Morphindinitrophenyläther bezeichnen wir als "Methode A". Zum Vergleich wurden die selben vier Opiummuster noch einmal nach dieser Methode analysiert, wobei je 0,500 g Opium statt in zwei Fraktionen (Filtrat I und II) direkt mit der fünfzigfachen Menge Kalkwasser durch wiederholte Mazeration extrahiert wurden (direkte Bestimmung). Die so ermittelten Morphinwerte stehen in guter Uebereinstimmung mit dem arithmetischen Mittel aus den Morphingehalten der Filtrate I und II.

Wie aus Tabelle 12 zu ersehen ist, erhält man bei Bestimmung des Morphins im aliquoten Teil (Filtrat I) des nach der Vorschrift der Ph.Helv.V durch einfache Mazeration mit der zehnfachen Menge Kalkwasser hergestellten Opiumauszuges einen gerin-

geren Morphingehalt als bei Bestimmung in dem durch wiederholte Mazeration mit insgesamt der fünfzigfachen Menge Kalkwasser erhaltenen Extrakt (direkte Bestimmung).

Tabelle 12 Morphingehalt in % nach Methode A

	Opium I	Opium II	Opium III	Opium IV
Filtrat I (= aliquoter Teil vom Extrakt 1:10, einfache Mazeration)	11,21 11,08 11,26	14,08 14,12 14,20	11,32 11,22	16,08 16,22 16,15
Mittelwert	11,17	14,11	11,27	16,15
Filtrat II (= Nachextraktion durch wiederholte Mazeration bis 1:50)	11,44 11,17 11,59	14,78 14,72 14,60	11,40 11,33	16,66 16,78 16,54
Mittelwert	11,40	14,70	11,37	16,66
Direkte Bestimmung (= wiederholte Mazera- tion 1:50)	11,27 11,45	14,36 14,45	11,58 11,24	16,45 16,53
Mittelwert	11,36	14,40	11,41	16,49

Es bleibt die Frage offen, ob diese Differenz zu Lasten der unvollständigen Extraktion oder einer unrichtigen Korrektur der Volumenzunahme des Opiumauszuges geht. Die Ph.Int.I lässt diese Volumenzunahme durch Bestimmung der Feuchtigkeit und des Extraktgehaltes für jedes Opiummuster eigens berechnen, doch sind die so ermittelten Morphinwerte innerhalb der üblichen Fehlerbreite dieselben wie nach Ph.Helv.V (s. Tabelle 15). Wir schliessen daraus, dass der durch nicht exakte Berücksichtigung der Volumensvermehrung gemachte Fehler relativ klein ist gegenüber dem durch unvollständige Extraktion. Da diese beiden Fehler sich addieren oder gegenseitig mehr oder weniger aufheben können, ist dieses Extraktionsverfahren ungenau.

2. Abtrennung der Hauptmenge an Begleitstoffen

Die Abtrennung der Hauptmenge an Begleitstoffen erfolgt bei den Kalkmethoden gleichzeitig mit der Extraktion, indem durch das Kalziumhydroxyd ein grosser Teil der Nebenalkaloide und Ballaststoffe ausgefällt wird. Die Auszüge sind aber immer noch

dunkelbraun gefärbt und enthalten rund 40 % Extraktstoffe. Ein weiterer Teil der Begleitstoffe wird entfernt, indem das Morphin in Gegenwart von Aether und Aethanol zur Kristallisation gebracht wird. Die Nebenalkaloide bleiben z.T. in der organischen Phase gelöst, jedoch auch eine geringe Menge Morphin, welches sich auf diese Weise der Bestimmung entzieht.

3. Isolierung und Bestimmung des Morphins

Bei allen officinellen Kalkmethoden erfolgt die Isolierung des Morphins durch Pufferung des Kalkauszuges auf den isoelektrischen Punkt des Morphins. Das zu diesem Zwecke zugefügte Ammonchlorid zersetzt das Kalziummorphinat unter Bildung von Ammoniummorphinat, letzteres hydrolysiert und die Morphinbase fällt aus. Die Tatsache, dass diese Fällung keineswegs quantitativ verläuft und die Gründe, weshalb je nach Opiummuster verschieden grosse Morphinmengen in der Mutterlauge verbleiben, wurden schon auf Seite 14/15 erwähnt und es wird auf das dort Gesagte verwiesen. Bei drei von den vier untersuchten Opiummustern fanden wir nach der Methode der Ph.Helv.V niederere Morphinwerte als nach Eder und Wäckerlin (33), deren Methode als eine der genauesten gilt.

Tabelle 13 Morphingehalt in % nach Methode Ph.Helv.V und Methode Eder-Wäckerlin (33) (Mittelwerte mehrerer Bestimmungen)

Methode	Opium I	Opium II	Opium III	Opium IV
Ph.Helv.V	10,18	14,36	10,70	15,58
Eder-Wäckerlin	11,66	14,24	11,24	15,89

Da nach beiden Methoden die eigentliche Bestimmung des Morphins in derselben Weise durch direkte Titration erfolgt und der bei der Extraktion nach Ph.Helv.V gemachte Fehler nicht so gross ist, dass er allein für die tiefen Pharmakopoe-Werte verantwortlich gemacht werden könnte (s. Tabelle 12), muss ein weiterer Fehler bei der Isolierung des Morphins gemacht werden, und zwar so, dass eine grössere Morphinmenge in der Mutterlauge verbleibt als durch den Korrekturfaktor der Ph.Helv.V ausgeglichen wird. Als Ursache dafür kann man eine mehr oder weniger grosse, durch die Begleitstoffe hervorgerufene Fällungshemmung sehen. Die Richtigkeit dieser Ansicht konnte durch Bestimmung des in der Mutterlauge verbliebenen Morphins bestätigt werden. Dazu musste eine Methode gewählt werden, welche die Wirkung der kristallisationshemmenden Stoffe aus-

zuschalten vermag. Als solche schien uns die bereits (Seite 27) beschriebene Methode A geeignet. Wegen der Schwerlöslichkeit und hohen Kristallisationsfähigkeit des dabei entstehenden Morphinindinitrophenyläthers wird die Ausfällung des Morphins in dieser Form viel weniger von Begleitstoffen beeinflusst, welche zudem durch die chromatographische Reinigung und durch das Ausschütteln zum grössten Teil eliminiert werden. Die Bestimmungen wurden wie folgt durchgeführt:

Die im Laufe von Morphinbestimmungen nach Ph.Helv.V nach dem Abfiltrieren der abgeschiedenen Morphinbase anfallende Mutterlauge wurde durch Zugabe von n-Salzsäure auf pH 4-5 gebracht, der Aether und Alkohol unter mässigem Erwärmen im Vakuum abgedunstet und die wieder erkaltete Mutterlauge nach der auf Seite 27 beschriebenen Methode A chromatographisch gereinigt, ausgeschüttelt und das Morphin als Dinitrophenyläther gefällt.

Tabelle 14 Morphingehalt des Ph.Helv.V - Kalkauszuges in %

Morphingehalt nach	Opium I	Opium II	Opium III	Opium IV
Methode Ph.Helv.V unkorrigiert	9,04	13,22	9,56	14,44
Methode Ph.Helv.V korrigiert (+ 1,14 %)	10,18	14,36	10,70	15,58
Methode A in der Mutterlauge	2,22	1,03	1,44	1,63

Wie aus der Tabelle zu ersehen ist, stimmt der Korrekturfaktor der Ph.Helv.V (= 1,14 %), welcher das in der Mutterlauge verbliebene Morphin ersetzen soll, sehr schlecht mit der effektiv in der Mutterlauge verbleibenden Morphinmenge (1,03 - 2,22%) überein. Dies steht in Uebereinstimmung mit der Tatsache, dass die Löslichkeit des Morphins sehr von der Art und Menge der in der Mutterlauge vorhandenen Begleitstoffe abhängt. Da die in der Mutterlauge bleibende Morphinmenge je nach Opiummuster verschieden ist, kann sie nicht durch einen starren Korrekturfaktor erfasst werden.

Die U.S.P. XV schreibt keinen derartigen Korrekturfaktor vor. Die Voraussetzung dafür, nämlich die quantitative Ausfällung des Morphins aus der Mutterlauge, ist jedoch auch hier nicht gegeben. Papierchromatographisch (24) konnten wir in der Mutterlauge noch nennenswerte Morphinmengen feststellen. Die quantitative Bestimmung dieses zurückgebliebenen Morphins führten wir in derselben Weise durch wie bei der Ueberprüfung der Ph.Helv.V-Methode. Bei Opium I fanden wir noch 1,84 % und bei

Opium II 0,84 % Morphin in der Mutterlauge. Diese Mengen gehen für die Bestimmung verloren und sicher erklären sich z.T. dadurch die gegenüber der Ph.Helv.V tieferen Morphinwerte der U.S.P. XV. Durch die wiederholte Mazeration des Opiums mit der annähernd fünfzigfachen Menge Wasser wird andererseits das Morphin quantitativ extrahiert, sodass bei den zwei untersuchten Opiummustern papierchromatographisch kein Morphin mehr im Opiumrückstand festgestellt werden konnte. Da nach der U.S.P. XV-Methode kleinere Morphinmengen in der Mutterlauge zurückbleiben als nach Ph.Helv.V, werden die fällungshemmenden Substanzen offenbar aus dem wässrigen Opiumauszug mit Kalziumhydroxyd besser ausgefällt als durch direkte Extraktion des Opiums mit Kalkwasser.

Eine weitere Fehlerquelle der Kalkverfahren liegt darin, dass das sich an der Oberfläche des alkalischen Opiumauszuges bildende Kalziumkarbonat gemeinsam mit dem Morphin abfiltriert wird und zu hohe Morphinwerte vortäuscht. Diesen Fehler behebt die Brit.Ph. 1958 und die ihr hinsichtlich der Morphinbestimmung entsprechenden anderen Arzneibücher, da nach ihnen das mit Kalziumkarbonat verunreinigte Morphin in Säure gelöst wird und der Säureverbrauch des Karbonates ebenfalls als Morphin berechnet wird. Auf Grund der stöchiometrischen Verhältnisse entspricht 1 mg Kalziumkarbonat 5,7 mg Morphinbase. Die Ph.Helv.V, die Ph.Int.I und die U.S.P.XV vermeiden diesen Fehler, indem sie das mit Kalziumkarbonat verunreinigte Morphin nicht in Säure sondern in Methanol auflösen lassen, worin Kalziumkarbonat unlöslich ist und somit nicht zur Bestimmung kommt.

Tabelle 15 Morphingehalt in % nach verschiedenen Pharmakopoe-Methoden

	Korr. %	Opium I	Opium II	Opium III	Opium IV
Ph. Helv. V	+1,14	10,17 10,09 10,27	14,37 14,46 14,25	10,60 10,72 10,79	15,56 15,67 15,49
Mittelwert		10,18	14,36	10,70	15,58
Brith. Ph. 1958	+1,14	9,92 10,04	14,17 14,36		
Ph. Int. I	+1,14	10,07 10,23	14,10 14,21	10,92 11,04	15,70 15,53
U. S. P. XV	--	9,02 9,22	13,07 13,40		

Chromatographische Reinheitsprüfung des zur Bestimmung gelangenden Morphins

Zur Ueberprüfung der Reinheit des zur Bestimmung gelangenden Morphins diente bisher neben der Aschenbestimmung und Feststellung der optischen Drehung hauptsächlich die Bestimmung des Methoxylgehaltes (32, 43, 83). Da mit Ausnahme von Oxydimorphin und Protopin, welche im Opium aber nur in sehr geringen Mengen vorkommen, alle anderen Nebenalkaloide mit bekannter Konstitution eine oder mehrere Methoxygruppen besitzen, enthält mit Nebenalkaloiden verunreinigtes Morphin ebenfalls Methoxyl. Der Methoxylgehalt des Morphins sagt aber noch nichts Genaueres aus über die qualitative Zusammensetzung der Verunreinigung und lässt auch nur ungefähre Schätzungen auf den prozentualen Gehalt an Nebenalkaloiden zu. So entspricht 1 mg Methoxyl 9,6 mg Kodein oder 4,44 mg Narkotin (eine bzw. drei Methoxygruppen).

Wir führten die Reinheitsprüfung mit Hilfe chromatographischer Methoden durch. Als Untersuchungsmaterial diente uns im Falle der Ph.Helv.V-Methode jener Teil der abfiltrierten Morphinbase, der durch das Behandeln mit Methanol in Lösung gebracht werden kann. Diese Lösung, in der das Morphin durch Titration bestimmt wird, ist gelb bis braun gefärbt und enthält somit gefärbte Verunreinigungen aus dem Opium. Papierchromatographisch (24) konnten wir in ihr neben dem Morphin noch erhebliche Mengen Kodein und Spuren Narkotin, Thebain und Narzein feststellen. Zur quantitativen Bestimmung trennten wir die Nebenalkaloide mit Hilfe der Ionenaustauschchromatographie vom Morphin, fällten sie als Reineckate und bestimmten sie nach Lee Kum-Tatt und Farmilo (65) spektrophotometrisch. Zur Trennung verwendeten wir den stark basischen Anionenaustauscher Dowex 2, welcher in der Basenform aus methanolischer Lösung Morphin im Gegensatz zu den nichtphenolischen Nebenalkaloiden zurückhält (35). Die Trennung und Bestimmung wurde wie folgt durchgeführt:

Die Titrationsflüssigkeit der Morphinbestimmung nach Ph.Helv.V wurde im Vakuum bei mässiger Wärme eingedampft, der Rückstand in 10 ml Methanol aufgenommen und diese Lösung auf eine Säule mit 10 g Dowex 2 (X-4,20 - 50 mesh, Basenform) in Methanol aufgegeben. Die Säule wurde mit Methanol nachgewaschen, bis mit 1 proz. Kalignostlösung in 5 Tropfen Eluat kein Kodein mehr nachgewiesen werden konnte. Durchflussgeschwindigkeit 3-5 ml/Minute. Das Eluat wurde in einem Rundkolben gesammelt, das Lösungsmittel bei vermindertem Druck abdestilliert, der Rückstand in 5 ml 2 n-Essigsäure aufgenommen und unter Nachspülen mit weiteren 5 ml 2 n-Essigsäure in ein kleines Becherglas überführt. Nach Zusatz von 10 ml frisch bereiteter 2 proz. Reineckesalz-Lösung blieb die Mischung eine halbe Stunde im Eisschrank stehen. Der entstandene Niederschlag wurde sodann in einem Glasfilter G4 gesammelt, mit eiskaltem Wasser bis zur Farblosigkeit des Filtrates gewaschen (ca. 20 ml) und durch Durchsaugen von Luft vom anhaftenden Wasser befreit. Dann wurde der Niederschlag im Filter in 2-3 ml Azeton gelöst und die Lösung unter Nachspülen mit Azeton quantitativ in

ein 10 ml Masskölbchen überführt. Das Masskölbchen wurde bis zur Marke mit Azeton aufgefüllt und die Extinktion der Lösung bei 525 m μ gegen reines Azeton gemessen. Der Gehalt an Nebenalkaloiden wurde nach folgender Formel als Kodein berechnet:

$$X = \frac{D \times V \times M}{\epsilon}$$

wobei: X = gefundene Menge Alkaloidbase in mg
 D = gemessene optische Dichte
 V = Volumen der Lösung in ml
 M = Molekulargewicht der Alkaloidbase
 ϵ = molare Extinktion des Alkaloidreineckates
 (für Kodein- und Morphinreineckat = 106,5)

Zur Ueberprüfung der Zuverlässigkeit des angegebenen Verfahrens wurden mehrere Trennungen von Morphin/Kodein-Gemischen durchgeführt. Die Abtrennung und Bestimmung des Kodeins erfolgte in der oben angegebenen Weise. Das vom Anionenaustauscher gebundene Morphin wurde mit 50 proz. Essigsäure eluiert (Durchflussgeschwindigkeit 3-5 ml/Minute), das Eluat im Vakuum auf wenige ml eingengt und das Morphin mit 1-Chlor-2,4-dinitrobenzol gefällt.

Tabelle 16 Trennung von Morphin und Kodein mit Dowex 2

zugefügt		gefunden	
Morphin mg	Kodein mg	Morphin mg	Kodein mg
127,3	5,8	124,2	5,7
194,0	7,3	190,4	7,4
300,8	18,2	297,3	18,0

Tabelle 17 Gehalt an Nebenalkaloiden in der Titrationsflüssigkeit nach Ph.Helv.V-Methode (berechnet als Kodein)

	Analysen- morphin mg	Kodein gefunden mg	Kodein gefunden %
Opium III	239,4	16,0	6,7
	236,6	15,5	6,5
Opium IV	360,5	18,4	5,1
	363,4	18,8	5,1

Wie aus obenstehender Tabelle zu ersehen ist, enthält das nach der Methode der Ph.Helv.V zur Titration gelangende Morphin erhebliche Mengen an Nebenalkaloiden,

welche als Morphin mittitriert werden und zu hohe Werte vortäuschen. Wir sehen darin neben der unvollständigen Extraktion des Morphins aus dem Opium und der je nach Opiummuster variierenden unvollständigen Ausfällung des Morphins aus dem Opiumauszug eine wichtige Fehlerquelle aller offizinellen Kalkmethoden.

22213 Mannich-Methode

Die Svenska Farmakopén 1946 übernahm die von Mannich (71) ausgearbeitete Morphinbestimmungs-Methode, nach welcher das Morphin aus dem wässrigen Opiumauszug als Dinitrophenyläther gefällt und gravimetrisch bestimmt wird. Die Ueberprüfung dieser Methode und Resultate nach diesem Verfahren sind auf Seite 34/35 angeführt.

2222 Die nicht offizinellen Methoden zur Bestimmung des Morphins im Opium

Es wurde bereits darauf hingewiesen, dass es wegen der Vielfalt der bisher ausgearbeiteten Morphinbestimmungsmethoden nicht möglich ist, diese in wenige Gruppen einzuteilen und trotzdem den Charakter der einzelnen Methode voll wiederzugeben. Um dennoch hinsichtlich ihrer Arbeitsweise ähnliche Methoden zusammenfassen zu können, haben wir als Gesichtspunkt für eine Unterteilung die Art und Weise der quantitativen Bestimmung des isolierten Morphins gewählt. Demnach ergibt sich eine Einteilung in gravimetrische, titrimetrische und kolorimetrische bzw. spektrophotometrische Methoden. Die bis 1936 bekanntgewordenen Methoden sind von Gränicher (43) zusammengestellt und überprüft worden, weshalb wir lediglich die ab dem Jahre 1937 veröffentlichten Methoden erwähnen.

22221 Gravimetrische Methoden

Methode von Mannich (71)

Das Verfahren beruht auf der Umsetzung des Morphins mit 1-Chlor-2,4-dinitrobenzol zum durchwegs sehr schwer löslichen Morphin-dinitrophenyläther.

1,000 g Opium wird mit Wasser unter Zusatz von Bleiazetat extrahiert. Zum Filtrat fügt man eine Lösung von Chlordinitrobenzol in Azeton sowie Ammoniak hinzu. Um das in Lösung befindliche Blei komplex in Lösung zu halten, wird ausserdem Zitronensäure zugegeben. Nach 24 Stunden wird der ausgefallene Morphinäther abfiltriert, gewaschen und nach einstündigem Trocknen gewogen.

Die Extraktion des Morphins aus dem Opium kann nach Mannich (71) auf drei verschiedene Arten erfolgen: durch einfache Mazeration, durch wiederholte Mazeration oder durch Perkolation. Das erstgenannte Verfahren wurde von der Svenska Farmakopén übernommen. Nach Angaben von Mannich selbst verläuft dabei die Extraktion des Morphins nicht vollständig und, da die Volumenzunahme des Opiumauszuges durch die Feuchtigkeit des Opiums und die extrahierten Substanzen nur durch einen starren Korrekturfaktor berücksichtigt wird, haften diesem Verfahren dieselben Mängel an wie den offizinellen Kalkmethoden: unvollständige Extraktion und nicht immer richtige Bemessung des aliquoten Teils des Opiumauszuges. Durch die wiederholte Mazeration bzw. die Perkolation des Opiums hingegen wird alles Morphin extrahiert, da wir in den Nachextraktionen der Opiumrückstände mit Methanol und n-Salzsäure papierchromatographisch (24) kein Morphin mehr nachweisen konnten.

Durch das Bleiazetat wird eine erhebliche Menge an nichtalkaloidischen Belegstoffen ausgefällt, sodass ein unter Zusatz dieses Salzes hergestellter Opiumauszug wesentlich heller ist als ein reiner Wasserauszug. Mannich (71) gibt an, dass durch das Bleiazetat die Azidität der Opiumauszüge aus dem schwach sauren in den annähernd neutralen Bereich hin verschoben wird (von pH 3 nach pH 6). Eine derartige Verschiebung des pH-Wertes konnten wir bei den von uns untersuchten Opiummustern nicht beobachten. Nach Zusatz der vorgeschriebenen Menge Bleiazetat trat nur eine geringfügige pH-Verschiebung gegen den neutralen Bereich hin ein; in einem Falle (Opium II) stellten wir im Gegenteil eine Verkleinerung des pH-Wertes fest. Wie aus den in Tabelle 18 zusammengestellten Zahlen ersichtlich ist, stellt sich durch das Bleiazetat in den Auszügen der vier untersuchten Opiummuster annähernd derselbe pH-Wert ein, welcher aber zu klein ist, um die schwächeren Basen (Narkotin, Papaverin) auszufällen. Dementsprechend fanden wir in den Opiumauszügen nach Mannich (71) papierchromatographisch (24) auch immer erhebliche Mengen dieser Alkaloide.

Tabelle 18 Einfluss von Bleiazetat auf den pH-Wert der Opiumauszüge

	Opium I	Opium II	Opium III	Opium IV
pH-Wert im wässrigen Opiumauszug	4,02	5,45	3,78	4,14
nach Zusatz von Bleiazetat	4,65	4,86	4,58	4,73

Die Fällung des Morphins durch Umsetzung zum sehr schwer löslichen Morphin-dinitrophenyläther verläuft quantitativ, denn in den Mutterlaugen konnten wir papierchromatographisch kein freies Morphin mehr nachweisen. Der gebildete Morphinäther ist in der Mutterlauge allerdings nicht völlig unlöslich. Die Verluste sind jedoch so gering (ca. 2 mg) und werden durch die ebenfalls geringen Verunreinigungen des abgeschiedenen Morphinäthers wieder ausgeglichen, sodass ein Korrekturfaktor nicht erforderlich ist. Zur Feststellung der Reinheit des ausgefallenen Morphinäthers wurde früher in erster Linie der Methoxylgehalt bestimmt, welcher wohl ungefähre Schätzungen des Gehaltes an Nebenalkaloiden (Kodein) zulässt, jedoch keinen Anhaltspunkt über das Mass an Verunreinigung mit methoxylfreien Substanzen gibt. Morphin-dinitrophenyläther ist eine schwache Base und kann mit 0,1 n-Salzsäure (71) oder in wasserfreiem Milieu mit Perchlorsäure (37) titriert werden, wodurch nicht titrierbare Verunreinigungen festgestellt werden können. Wir überprüften die Reinheit des ausgefallenen Morphin-dinitrophenyläthers einerseits mit Hilfe der Papierchromatographie und andererseits durch Vergleich der titrimetrischen und gravimetrischen Bestimmung. Bei der Titration mit 0,1 n-Salzsäure gegen Mthylorange ist der Umschlagspunkt des Indikators nur schlecht erkennbar. Methylrot gibt einen schärferen Farbumschlag, doch tritt dieser zu früh ein, weshalb eine Korrektur angebracht werden muss (71, 83). Wir entschieden uns daher für die wasserfreie Titration mit Perchlorsäure, bei welcher man mit Kristallviolett einen sehr scharfen Farbumschlag erhält. Papierchromatographisch (24) konnten wir erst nach Digerieren einer grösseren Menge Morphin-dinitrophenyläther (ca. 1 g) mit Methanol und Abfiltrieren des in diesem Lösungsmittel im Gegensatz zu den freien Alkaloiden sehr schwer löslichen Morphin-dinitrophenyläthers im eingeeengten Methanol geringe Mengen Kodein nachweisen.

Tabelle 19 Morphingehalt in % nach der Mannich-Methode und titrimetrischer Bestimmung mit Perchlorsäure

	Einmalige Mazeration (Svenska Farmakopén)		Wiederholte Mazeration	
	gravimetrisch	titrimetrisch	gravimetrisch	titrimetrisch
Opium I	11,56	11,21	11,91	11,52
	11,57		11,83	11,47
Opium II	14,55	14,24	14,80	14,65
	14,65		14,92	14,78
Opium III	11,27	11,15	11,54	11,41
	11,18		11,40	11,34
Opium IV	15,72	15,68	16,18	15,98
	15,85		16,23	16,02

Wie aus Tabelle 19 zu ersehen ist, erhält man mit der Mannich-Methode höhere Morphinwerte als mit den anderen bisher erwähnten Verfahren, was darauf zurückzuführen ist, dass das gesamte im Opiumauszug vorliegende Morphin erfasst wird. Daraus ergibt sich gegenüber den Kalkmethoden der Vorteil, dass keinerlei Korrekturfaktor notwendig ist. Aus dem Vergleich der durch Wägung und Titration des Morphin-dinitrophenyläthers ermittelten Morphinwerte ist ersichtlich, dass dieser je nach Opiummuster mehr oder weniger stark verunreinigt ist. Vollmer (104) wies nach, dass die Art und Menge der in der Mutterlauge vorhandenen Kolloidstoffe dafür verantwortlich ist, dass der ausfallende Morphin-dinitrophenyläther geringe Mengen Nebenalkaloide mitzureisen vermag. Die Reinigung des Opiumauszuges, aus dem der Morphin-dinitrophenyläther gefällt werden soll, ist deshalb bei dieser Methode das vordringlichste Problem.

In diesem Sinne stellt die Methode von Koch und Hannig (60) einen Rückschritt dar, da die Fällung in einem völlig ungereinigten Wasserauszug vorgenommen wird. Pinxteren und Smeets (83) sowie Witte (107) fällen das Morphin in einem mit Manganchlorid gereinigten Kalkauszug und Böhme und Strohecker (21) reinigen den Opiumauszug auf chromatographischem Wege mit Hilfe von Aluminiumoxyd. Dieses genaue, aber etwas umständliche und langwierige Verfahren wurde von Fischer und Folberth (36) ganz wesentlich vereinfacht, sodass diese Methode geeignet erscheint, die ursprüngliche Methode von Mannich (71) zu ersetzen.

Methode von Fischer und Folberth (36)

1,000 g Opium wird mit 5 ml Wasser verrieben und die Anreibung auf eine Säule von 10 g Aluminiumoxyd "Woelm sauer" in einem Allihnschen Rohr aufgegeben. Unter mässigem Saugen perkoliert man sodann mit insgesamt 35 ml Wasser. Im Filtrat wird das Morphin mit Chlordinitrobenzol gefällt und gravimetrisch bestimmt.

Die Aluminiumoxydsäule hält einen grossen Teil der Ballaststoffe zurück, erkennbar an der Braunfärbung des Aluminiumoxydes und der hellgelben Farbe des Extraktes. Die Extraktion ist jedoch etwas mühsam, da die sedimentierenden Opiumteilchen auf der Oberfläche des Aluminiumoxydes eine kompakte Masse bilden, durch welche das Wasser nur schwer hindurchdringen kann und die quantitative Extraktion des Morphins u.U. in Frage gestellt wird. Auf diesen Umstand führen wir die Streuung der mit einem Opiummuster gefundenen Morphinwerte zurück ($\pm 0,2\%$). Auch ist die apparative Durchführung der Extraktion nicht sehr vorteilhaft ("das Allihnsche Rohr mit dem

Aluminiumoxyd wird zum Zwecke des Absaugens mittels doppelt durchbohrten Korken in einem durchbohrten Einsiedeglasdeckel befestigt und in das zugehörige Einsiedeglas ein Erlenmeyer-Kolben zum Auffangen des Filtrates gestellt"). In neuester Zeit veröffentlichte Teijgeler (101) die Ergebnisse seiner Ueberprüfung des Verfahrens von Fischer und Folberth (36), welche die Resultate unserer Untersuchungen bestätigen. Da die Methode im Prinzip jedoch sehr einfach und mit einem Minimum an Zeit, Apparaten und Reagenzien durchführbar ist, entschlossen wir uns, sie in modifizierter Form als neue Pharmakopoe-Methode vorzuschlagen (s. S. 47 ff.).

Svensen und Aarnes (101) verwenden ebenfalls Aluminiumoxyd zur Reinigung des Opiumauszuges, extrahieren das Opium jedoch nicht mit Wasser sondern mit einem organischen Lösungsmittel. Die Methode wurde von Garratt, Johnson und Lloyd (37) übernommen und in einigen Punkten modifiziert.

Methode von Garratt, Johnson und Lloyd (37)

1,000 g Opium wird unter Zusatz von Ammoniak und Aethanol mit Aluminiumoxyd (standardisiert nach Brockmann) verrieben, die Masse in eine Chromatographieröhre gefüllt und mit Chloroform/Isopropanol 3:1 perkoliert. Aus dem organischen Auszug, welcher neben den Alkaloiden noch erhebliche Mengen nichtalkaloidischer Extraktstoffe enthält, wird das Morphin mit Natronlauge ausgeschüttelt und mit dem von Dann und Wipperfurth (27) vorgeschlagenen 1-Fluor-2,4-dinitrobenzol gefällt und gravimetrisch bestimmt.

Um festzustellen, ob mit den von obigen Autoren vorgeschriebenen 100 ml Chloroform/Isopropanol-Gemisch (Svensen und Aarnes (101) verlangen 240 ml) alles Morphin aus dem Opium extrahiert werden kann, zogen wir den Opiumrückstand mit weiteren 2x50 ml dieses Lösungsmittelgemisches aus. Im Gegensatz zum ersten Auszug waren diese Nachextraktionen nahezu farblos, die ersten 50 ml enthielten jedoch, wie wir papierchromatographisch (24) feststellen konnten, noch geringe Mengen Morphin, während die zweite Nachextraktion bei allen vier untersuchten Opiummustern morphinfrei war. Um den Morphingehalt in der ersten Nachextraktion festzustellen, wurde das Lösungsmittel abdestilliert, der Rückstand in 30 ml Azeton aufgenommen und die Lösung mit 0,25 g Chlordinitrobenzol, 4 ml 25 proz. Ammoniak und 36 ml Wasser versetzt. Die Lösung war nach 12 Stunden noch völlig klar und zeigte erst nach Animpfen mit Morphin-dinitrophenyläther eine geringe Trübung. Blindversuche mit 1,2 und 3 mg Morphinbase zeigten, dass 2 mg Morphin beim oben beschriebenen Versuch nach Animpfen eine geringe Trübung ergeben, während die Lösung mit 1 mg Morphin völlig klar blieb und die mit 3 mg einen geringen Niederschlag aufwies. Die im Opiumrückstand verbliebene

Morphinmenge betrug dementsprechend höchstens 2 mg (= 0,2 %, bezogen auf die Opiumeinwaage). Da dieser Befund bei allen vier Opiummustern derselbe war, halten wir die vorgeschriebene Lösungsmittelmenge für nicht ausreichend, um die quantitative Morphinextraktion sicherzustellen. Nach Perkolation mit 150 ml Chloroform/Isopropanol konnte papierchromatographisch (24) im Rückstand kein Morphin mehr nachgewiesen werden. Bei den Ausschüttelungen bildeten sich manchmal Emulsionen, welche sich oft erst nach längerer Zeit trennten. Die nach dieser Methode gefundenen Morphinwerte entsprechen denen nach Mannich (71). Die grössere Reinheit des ausgefallenen Morphin-dinitrophenyläthers geht aus der guten Uebereinstimmung von gravimetrisch und titrimetrisch gefundenen Werten hervor. Diese Werte sind in Tabelle 20 angeführt, eine Gegenüberstellung mit den nach anderen Methoden ermittelten Morphinwerten wird in Tabelle 29 gegeben.

Tabelle 20 Morphingehalt in % nach der Methode von Garratt, Johnson und Lloyd (37)

	Opium I	Opium II	Opium III	Opium IV
gravimetrisch	11,70 11,64	14,70 14,59	11,25 11,30	16,28 16,37
titrimetrisch	11,59	14,50	11,22	16,20

22222 Titrimetrische Methoden

Die in dieser Gruppe zusammengefassten Methoden haben im allgemeinen dasselbe Arbeitsprinzip wie die bereits beschriebenen officinellen Kalkmethoden: Extraktion des Opiums mit einem wässrigen Lösungsmittel, Ausfällen der Morphinbase durch Pufferung der Lösung auf den isoelektrischen Punkt des Morphins und titrimetrische Bestimmung der abfiltrierten Morphinbase. Bei den Pharmakopoe-Methoden erfolgt die Ausfällung der Morphinbase direkt aus dem Opiumauszug und wird deshalb von den vielen Begleitstoffen so beeinflusst, dass je nach Opiummuster eine verschieden grosse Morphinmenge in der Mutterlauge zurückbleibt und eine verschieden grosse Menge Nebenalkaloide mit dem Morphin ausgefällt wird. Diese Umstände bilden die Ursache für die unregelmässigen Ergebnisse dieser Methoden. Es sind daher zahlreiche Versuche unternommen worden, die Nebenalkaloide vor der Fällung zu beseitigen, oder das Morphin aus der Opiumextraktlösung herauszunehmen und in einem definierten Milieu den variierenden Einfluss der fällungshemmenden Substanzen auszuschalten.

Die im Jahre 1937 von Knaffl-Lenz (58), Baggesgaard-Rasmussen und Jespersen (13) sowie Eder und Wäckerlin (32) veröffentlichten Methoden wurden auf Grund eines vom seinerzeitigen Völkerbund erlassenen Aufrufes zur Schaffung einer internationalen Morphinbestimmungsmethode ausgearbeitet und sind mit denselben Opiummustern durchgeführt, sodass sich gute Vergleichsmöglichkeiten bieten. Die Autoren haben ihre Methoden in den folgenden Jahren modifiziert oder durch neue ersetzt, weshalb wir die aus dem Jahre 1937 stammenden Methoden als überholt betrachten. Dasselbe gilt für die Methode von Dowzard, Thomas und Russo (29). Von einer neuerlichen Ueberprüfung haben wir daher abgesehen. Eine zusammenfassende Kritik der eben erwähnten Verfahren findet sich bei Vollmer (104).

Methode von Eder und Wäckerlin 1940 (33)

Dieser Methode gingen zwei ähnliche Verfahren voraus, die schon erwähnte Methode 1937 und eine erste Modifikation im Jahre 1939 (33). Die Methode 1940 liefert dieselben Resultate wie die vorhergehende, ist jedoch wesentlich einfacher und rascher durchführbar und wird allgemein als eine der genauesten Methoden zur Bestimmung des Morphins im Opium angesehen.

1,00 g Opium wird mit der fünfzigfachen Menge Wasser unter Zusatz von Kalziumhydroxyd und Mangansulfat durch wiederholte Mazeration extrahiert. Der Kalkauszug wird mit Benzol/Tetrachlorkohlenstoff 1:1 ausgeschüttelt und dadurch der Großteil der Nebenalkaloide entfernt. Darauf wird der Kalkauszug mit Ammonsulfat gepuffert und das Morphin mit Chloroform/Isopropanol 3:1 ausgeschüttelt. Die das Morphin enthaltenden organischen Auszüge werden durch eine Säule von Aluminiumoxyd (standardisiert nach Brockmann) filtriert und das Lösungsmittel abdestilliert. Der Rückstand wird in Natronlauge, Aether und Alkohol gelöst, das Morphin mit Ammonchlorid gefällt, abfiltriert, in Methanol gelöst und titriert.

Um die Vollständigkeit der Morphinextraktion nach dem von den Autoren vorgeschriebenen Verfahren zu überprüfen, haben wir die im Filter zurückgebliebenen Opiumrückstände zunächst mit 30 ml Methanol und hierauf mit 30 ml n-Salzsäure nachextrahiert. Papierchromatographisch (24) konnten wir in diesen Nachextraktionen kein Morphin mehr nachweisen. Dieser Befund war bei allen von uns untersuchten Opiummustern derselbe, wodurch die Vollständigkeit der Morphinextraktion nach Eder und Wäckerlin (33) bestätigt werden konnte. Durch das Behandeln des Opiumrückstandes mit Methanol werden aus demselben aber noch Thebain, Papaverin und Narkotin extrahiert, jedoch kein Kodein mehr, welches demnach wie das Morphin quantitativ mit Kalkwasser extrahiert wird.

Die Mutterlauge der Morphinfällung enthält noch geringe Mengen Nebenalkaloide: die Entfernung derselben aus dem Kalkauszug durch die einmalige Ausschüttelung mit Benzol/Tetrachlorkohlenstoff ist somit nicht vollständig. Papierchromatographisch (24) konnten wir nachweisen, dass bei dieser Ausschüttelung kein Morphin verloren geht. Durch das Behandeln des Opiums mit Kalkwasser wird ein weiteres Alkaloid extrahiert, welches sich durch die Rotfärbung beim Erwärmen mit Salzsäure nachweisen und als Porphyroxin-Mekonidin identifizieren lässt. Wie unsere Untersuchungen gezeigt haben, wird durch die Extraktion nach Eder und Wackerlin (33) die gesamte Menge dieses Alkaloides aus dem Opium extrahiert, z.T. mit den Nebenalkaloiden ausgeschüttelt, sich aber hauptsächlich im Destillationsrückstand der Morphinausschüttelungen befindet. Ausschüttelungsversuche bei verschiedenem pH ergaben, dass bei pH 8-9 durch zweimaliges Ausschütteln mit Benzol/Tetrachlorkohlenstoff 1:1 alles Porphyroxin-Mekonidin aus dem Kalkauszug entfernt werden kann und der Rückstand der Morphinausschüttelung beim Erwärmen mit Salzsäure keine Rotfärbung mehr zeigt.

Die bei der Fällung des Morphins in der Mutterlauge verbleibende Morphinmenge wird durch den in Versuchen mit reiner Morphinbase ermittelten Korrekturfaktor ausgeglichen. Die Anwendung dieses Faktors auf die Morphinbestimmung in Opium ist aber nur dann gerechtfertigt, wenn es gelingt, das aus dem Opium isolierte Morphin so vollständig von allen Begleitstoffen zu befreien, dass es in ebenso reiner Form vorliegt wie bei der Ermittlung des Korrekturfaktors. Dass die Erfüllung dieser Voraussetzung nicht gegeben ist und der mit reinem Morphin ermittelte Korrekturfaktor für die Bestimmung in Opium zu klein ist, geht schon daraus hervor, dass beim Einbau einer zusätzlichen Reinigungsoperation in die Methode 1937 (Filtration der Morphinausschüttelung durch Aluminiumoxyd) die Morphinwerte eine Erhöhung bis zu 0,5 % erfuhren, obwohl die Korrektur für die Mutterlaugenverluste dieselbe blieb. Unsere Versuche haben ergeben, dass der Destillationsrückstand der Morphinausschüttelung noch 10-20 % Verunreinigungen enthält und somit eine Fällungshemmung zu erwarten ist. Die tatsächlich in der Mutterlauge verbliebene Morphinmenge haben wir auf folgendem Wege ermittelt:

Die beim Abfiltrieren der ausgeschiedenen Morphinbase anfallende Mutterlauge wurde direkt in einen Scheidetrichter hineingesaugt und mehrmals mit Chloroform/Isopropanol 3:1 ausgeschüttelt. Die vereinigten Ausschüttelungen (ca. 70 ml) wurden in einem Kolben gesammelt, das Lösungsmittel abdestilliert und der Rückstand in 10 ml Methanol aufgenommen. Die Trennung des Morphins von den Nebenalkaloiden erfolgte in der auf Seite 32 beschriebenen Weise durch Ionenaustausch. Das von der Säule eluierte Morphin wurde als Reineckat gefällt und in der auf Seite 32 für Kodein beschriebenen Weise spektrophotometrisch bestimmt.

Die Resultate dieser Bestimmungen sind in Tabelle 21 angeführt. Während in Versuchen mit reiner Morphinbase 4,4 mg Morphin in der Mutterlauge gelöst bleiben, fanden wir in den Mutterlauge von Morphinbestimmungen in Opium mit 10,4 - 17,9 mg Morphin viel grössere und von Opium zu Opium unterschiedliche Mengen. Dieses Resultat zeigt neuerdings, dass die Mutterlauge-Verluste mit einem starren Korrekturfaktor nicht ausgeglichen werden können. In einer weiteren Versuchsserie haben wir das Morphin statt als Base als Dinitrophenyläther gefällt. Auf diese Weise war es uns möglich, das gesamte Morphin zu erfassen und den unsicheren Faktor für die Mutterlauge-Verluste fallen zu lassen. Die Resultate finden sich in Tabelle 21. Zum Nachweis eventueller alkaloidischer Verunreinigungen des zur Titration gelangenden Morphins wurde die autitrierte Lösung im Vakuum zur Trockene eingedampft, der Rückstand in Methanol aufgenommen und die Nebenkaloide durch Ionenaustausch (s. S. 32) vom Morphin getrennt. Papierchromatographisch (24) konnten wir nur Kodein als Verunreinigung nachweisen und somit seinen Gehalt aus dem von Eder-Wäckerlin (33) ermittelten Methoxylgehalt berechnen. Im Gegensatz zu den offizinellen Kalkmethoden ist der so ermittelte Kodeingehalt des zur Titration gelangenden Morphins mit 1,6 - 2,9 % relativ gering. Dies unterstreicht die Notwendigkeit, die Nebenkaloide vor der Ausfällung des Morphins als Base weitgehendst zu entfernen.

Tabelle 21 Ueberprüfung der Methode von Eder und Wäckerlin (33)

	Opium I	Opium II	Opium III	Opium IV
Extraktgehalt in %	61,30	60,59	63,87	62,13
pH der Mutterlauge	8,77	8,71	8,68	8,76
Rohmorphin in g	0,1260	0,1661	0,1353	0,1870
Morphingehalt in %	11,72 11,60	14,18 14,30	11,29 11,18	15,95 15,84
Methoxylgehalt in mg	0,24		0,17	0,30
berechnet als Kodein in mg	2,3		1,6	2,9
mg Morphin in der Mutterlauge	12,4	10,3	12,8	17,9
Morphingehalt in % nach Fällung als Dinitrophenyläther	11,40	14,36	11,38	16,32

Die quantitative Ausfällung von reiner Morphinbase bietet bei allen bisher erwähnten Verfahren die grösste Schwierigkeit und ist, wie unsere Ueberprüfung zeigte,

selbst bei der sonst sehr gut ausgearbeiteten Methode von Eder und Wackerlin (33) nicht vollständig. Zudem verlängert diese Operation die für eine Morphinbestimmung notwendige Zeit ganz erheblich, da eine Fällungsdauer von 12-24 Stunden eingehalten werden muss. Es war daher naheliegend, dass bei der Ausarbeitung neuer Morphinbestimmungsmethoden versucht wurde, die Fällung der Morphinbase als Mittel zur Reinigung durch andere, schneller und sicherer durchführbare Reinigungsoperationen zu ersetzen. Durch die vom Sekretariat der Vereingten Nationen mitgeteilte (92) und nachfolgend kurz beschriebenen Morphinbestimmungsmethode wird versucht, das Morphin durch eine Reihe von Ausschüttelungen so rein zu isolieren, dass es ohne Umfällung direkt titriert werden kann.

6,00 g Opium werden mit der fünfzehnfachen Menge Kalkwasser durch einfache Mazeration extrahiert. Ein aliquoter Teil des Auszuges wird nach Zusatz von Ammonchlorid in einem Extraktionsapparat mit Aether/Azeton 3:2 4-5 Stunden lang extrahiert. Der Auszug erhält die gesamten Alkaloide. Das Lösungsmittel wird abdestilliert, der Rückstand in Chloroform aufgenommen und die Lösung in Chloroform mit verdünnter Dichloressigsäure ausgeschüttelt. Das Morphin geht in die Dichloressigsäure und wird daraus nach Zusatz von Ammoniak mit Chloroform/Isobutanol 3:2 ausgeschüttelt. Nach Abdestillieren des Lösungsmittels wird der Rückstand in Methanol aufgenommen und das Morphin durch Titration bestimmt.

Diese Methode ist mit einer Reihe von Mängeln behaftet. Die Extraktion der für eine Analyse unnötig grossen Opiummenge geschieht durch einfache Mazeration, wobei, wie am Beispiel der officinellen Kalkmethoden gezeigt wurde, nicht alles Morphin extrahiert wird. Die notwendige Korrektur der Volumenzunahme des Opiumauszuges und die Weiterverarbeitung eines aliquoten Teils desselben bedeuten weiter Fehlerquellen. In einer vom Sekretariat der Vereingten Nationen herausgegebenen Mitteilung (96) wird die Methode einer eingehenden Kritik unterzogen.

Knafl-Lenz (59) versuchte durch eine besondere Extraktionsweise und durch eine Reihe von Ausschüttelungen das Morphin so rein aus dem Opium zu isolieren, dass es direkt durch Titration bestimmt werden konnte.

3,00 g bei 105^o getrocknetes Opium werden mit Tetrachlorkohlenstoff digeriert und das Lösungsmittel abfiltriert. Der Opiumrückstand wird mehrmals mit Wasser unter Zusatz von Natriumsulfat digeriert. Ein aliquoter Teil des Opiumauszuges wird zur Entfernung der Nebenalkaloide mit Benzol und nach Zusatz von Natriumbikarbonat zur Gewinnung des Morphins mit Chloroform/Aethanol ausgeschüttelt. Das Lösungsmittel wird abdestilliert, das zurückbleibende Morphin in überschüssiger Säure gelöst und durch indirekte Titration bestimmt.

Die Methode bringt gegenüber den bisherigen Ausschüttelungsmethoden keinen wesentlichen Vorteil, ausser, dass die früher zum Zwecke der Reinigung übliche Ausfäll-

lung der Morphinbase weggelassen oder durch eine rascher durchführbare Umkristallisation ersetzt wird. Die vorgeschriebene Extraktionsweise ist sehr umständlich, muss doch der Opiumrückstand wiederholt aus dem Filter zur Nachextraktion in ein Kölbchen überführt werden. Durch das Behandeln des Opiums mit Tetrachlorkohlenstoff werden Fettstoffe, ein Teil der Nebenalkaloide aber auch geringe Mengen Morphin entfernt, wie wir bei der papierchromatographischen Ueberprüfung feststellen konnten. Der Autor stützte sich bei der Ausarbeitung der Methode offenbar auf die Schwerlöslichkeit der reinen Morphinbase und ihrer Salze in Tetrachlorkohlenstoff. Dies trifft jedoch für das im Opium vorliegende Morphin nicht zu, da die Begleitstoffe eine bedeutende Vergrößerung der Löslichkeit bewirken. Durch die einmalige Ausschüttelung des Opiumauszuges mit Benzol werden die Nebenalkaloide nicht restlos vom Morphin abgetrennt, sodass das zur Titration gelangende Morphin mit Nebenalkaloiden verunreinigt ist. Das beim Abdestillieren der Morphinausschüttelungen zurückbleibende Morphin war bei den von uns untersuchten Opiummustern noch ziemlich stark braun gefärbt und enthielt somit ausser Nebenalkaloiden noch sonstige Verunreinigungen aus dem Opium. Wie aus der Gegenüberstellung der nach verschiedenen Methoden erhaltenen Werte in Tabelle 29 hervorgeht, erhält man nach Knafl - Lenz (59) ziemlich tiefe Morphingehalte. In der folgenden Tabelle sind die nach dieser Methode im getrockneten Opium gefundenen sowie die auf nicht getrocknetes Opium umgerechneten Werte angegeben.

Tabelle 22 Morphingehalt in % nach der Methode Knafl - Lenz (59)

	getrocknetes Opium	nicht getrocknetes Opium
Opium I	11,34	10,70
	11,27	10,63
Opium III	11,01	10,47
	10,92	10,40

Graf (41) versuchte auf chromatographischem Wege das Morphin so rein aus dem Opium zu isolieren, dass es direkt durch Titration bestimmt werden könnte.

0,200 g Opium wird mit 1 ml Wasser digeriert, die Mischung alkalisiert und mit Kieselgur verrieben. Die Masse wird in eine Chromatographieröhre gefüllt und zuerst mit Dichloräthylen zur Entfernung der Nebenalkaloide und dann mit Chloroform/Isopropanol 3:1 zur Gewinnung des Morphins perkoliert. Das Lösungsmittel der Morphinfraktion wird abdestilliert, der Rückstand in Methanol aufgenommen und das Morphin mit 0,1 n-Salzsäure gegen Methylrot bis auf "kräftig rote Farbe" titriert.

Wir überprüften dieses im Prinzip und in der Ausführung sehr einfache Verfahren zunächst mit einem Gemisch reiner Opiumalkaloide, welches wir in gleicher Weise wie für Opium vorgeschrieben behandelten. Graf (41) definiert die von ihm verwendete Kieselgursorte nicht näher und verlangt lediglich eine möglichst wenig adsorbierende Sorte. Wir verwendeten für unsere Versuche "Hyflo Super-Cel" (Firma Johns-Manville Co., London). Das zur Eluierung der Nebenalkaloide dienende Dichloräthylen wurde in drei Fraktionen zu je 30 ml aufgefangen und jede Fraktion für sich papierchromatographisch (24) untersucht. Jede der drei Fraktionen enthielt ausser den Nebenalkaloiden noch Morphin, welches auf diese Weise für die Bestimmung verloren geht. Die Morphinfraktion war hingegen frei von Nebenalkaloiden. Mit "Hyflo Super-Cel" als Träger und Dichloräthylen als Lösungsmittel ist demnach wohl eine quantitative chromatographische Abtrennung der Nebenalkaloide vom Morphin möglich, doch geht dabei Morphin verloren. Die Vorschrift von Graf (41) auf "kräftig rote Farbe" zu titrieren, ist ungenau und soll wohl eine Art von Korrekturfaktor darstellen, welcher aber sicher nicht auf alle Opiumsorten angewendet werden kann. In unseren Versuchen titrierten wir das Morphin zunächst bis zum Farbumschlag von Methylrot und dann auf kräftig rote Farbe. Anschliessend wurde die Titrationsflüssigkeit im Vakuum zur Trockene eingedampft, der Rückstand in 5 ml 2 n-Essigsäure aufgenommen, das Morphin als Reineckat gefällt und spektrophotometrisch bestimmt (s.S. 33).

Tabelle 23 Ueberprüfung der Methode Graf (41) mit reinen Alkaloiden

Morphinbase vorgelegt mg		Morphinbase gefunden mg		
a)	b)	a)	b)	
28,85	25,4	25,6	23,1	titriert bis Farbumschlag titriert bis "kräftig rot" als Reineckat bestimmt
		27,0	24,5	
		25,1	23,1	

Wie aus Tabelle 23 ersichtlich ist, gelang es uns nicht, nach dem vorgeschriebenen Verfahren das vorgelegte Morphin quantitativ wiederzufinden. Nachdem wir papierchromatographisch nachweisen konnten, dass ein Teil des Morphins bereits mit den Nebenalkaloiden eluiert wird, entsprechen die Resultate unseren Erwartungen. In Opium wird die Löslichkeit des Morphins in Dichloräthylen durch die vielen Begleitstoffe noch vergrössert, sodass mit noch höheren Verlusten zu rechnen ist. Der beim Abdestillieren

der Morphinfraction aus Opium zurückbleibende Rückstand ist dunkelbraun gefärbt, woraus zu ersehen ist, dass mit dem Morphin noch gefärbte Begleitstoffe aus dem Opium eluiert werden, die, falls sie saure oder basische Gruppen besitzen, die Titration des Morphins stören. Wir fällten daher nach der Titration das Morphin als Reineckat und bestimmten es spektrophotometrisch (s.S. 33). Die auf diese Weise gefundenen Morphinwerte liegen teils über, teils unter denen durch Titration gefundenen (s. Tabelle 24), was besagt, dass aus der Menge der zur Neutralisation der morphinhaltigen Lösung benötigten Säure nicht ohne weiteres auf den tatsächlichen Morphingehalt geschlossen werden kann. Als weitere Fehlerquellen betrachten wir eine eventuelle oxydative Zersetzung von Morphin beim Versetzen der heissen Opiumverreibung mit Ammoniak und die Möglichkeit, dass Ammoniak durch das Chloroform/Isopropanolgemisch miteluiert wird und die Titration stört. In Tabelle 24 sind die nach der Methode Graf (41) erhaltenen Morphinwerte angeführt. Eine Gegenüberstellung mit den nach anderen Methoden gefundenen Werten wird in Tabelle 29 gegeben.

Tabelle 24 Morphin Gehalt in % nach der Methode Graf (41)

	titriert nach Graf	gefällt als Reineckat
Opium I	11,12 11,10	11,2
Opium III	9,99 9,80	11,1
Opium IV	15,73 15,68	15,9

223 Vorschlag einer Morphinbestimmungsmethode als neue Pharmakopoe-Methode

Die wichtigsten Unzulänglichkeiten der Morphinbestimmungsmethode der Ph. Helv.V und der anderen offizinellen Kalkmethoden sehen wir in der unvollständigen Extraktion des Morphins aus dem Opium und in der Tatsache, dass ein unkontrollierbarer Anteil des Morphins bei der Fällung in der Mutterlauge verbleibt. Das zur Bestimmung gelangende Morphin enthält 5-10 % Nebenalkaloide, welche als Morphin mittitriert werden. Nachteilig ist ferner die lange Dauer einer Bestimmung und die dafür notwendige, verhältnismässig grosse Menge von 5 g Opium.

Bei der Ausarbeitung einer neuen Pharmakopoe-Methode waren wir daher bestrebt, gegenüber der Methode der Ph.Helv.V folgende Verbesserungen anzubringen:

1. Quantitative Extraktion des Morphins aus dem Opium
2. Quantitative Bestimmung des Morphins
3. Schnellere Durchführbarkeit einer Bestimmung
4. Kleinere Opiummenge

Von der ursprünglich angestrebten gleichzeitigen Bestimmung der wichtigsten Nebenalkaloide kamen wir im Verlaufe unserer Versuche ab, weil damit die prinzipielle Einfachheit und rasche Durchführbarkeit als wesentliche Vorteile der vorgeschlagenen Methode verloren gingen. Da weiterhin in erster Linie das Morphin allein bestimmt wird, halten wir es für vorteilhafter, zwei verschiedene Methoden vorzuschlagen: eine, durch die Beschränkung auf ein einziges Alkaloid relativ einfach zu gestaltende Morphinbestimmungsmethode und eine naturgemäss kompliziertere Methode zur Bestimmung der wichtigsten Nebenalkaloide. Die von uns vorgeschlagene Morphinbestimmungsmethode stellt eine Modifikation des von Fischer und Folberth (36) bekanntgegebenen Verfahrens dar. Wir lassen hier gleich die Arbeitsvorschrift folgen und werden im Anschluss daran die einzelnen Phasen des Arbeitsganges begründen.

Arbeitsvorschrift:

1 g pulverisiertes Opium (auf drei Dezimalen genau gewogen) wird in einer Reibschale mit 1 ml Wasser zu einem möglichst homogenen Brei verrieben und dieser mit ungefähr 5 g Aluminiumoxyd "Woelm sauer" sorgfältig vermischt. In den verengten Teil einer Chromatographieröhre (20-30 cm lang, 1,5 - 2 cm Durchmesser) wird über dem Hahn ein Wattebausch gebracht und die Röhre etwa zur Hälfte mit Wasser gefüllt. Auf die Oberfläche des Wassers lässt man in dünnem Strahl 5 g Aluminiumoxyd "Woelm sauer" niederrieseln und sich absetzen. Eventuell eingeschlossene Luftblasen werden durch Aufwirbeln des Aluminiumoxydes mit einem Glasstab ausgetrieben. Das in der Röhre befindliche Wasser lässt man bis auf etwa 3 cm über dem Aluminiumoxyd ablaufen, füllt sodann die Opium/Aluminiumoxyd-Anreicherung in die Röhre und schlämmt sie in dem Wasser durch Umrühren mit einem Glasstabe auf. Die Reste der Opiumverreibung am Pistill und in der Reibschale wischt man mit einem mit Wasser befeuchteten Wattebausch ab, bringt auch diesen in das Rohr und presst ihn mit mässigem Druck auf die Säule. Beim Hinunterschieben der Watte achtet man darauf, dass das an der Innenwand des Rohres haftende Opium und Aluminiumoxyd von der Watte mitgenommen wird. Unter die Röhre stellt man

einen tarierten, 100 ml fassenden Erlenmeyerkolben, wenn möglich mit Schliffverschluss, und öffnet den Hahn der Röhre so weit, dass ein Tropfen Filtrat pro Sekunde fällt. Verläuft die Perkolation zu langsam, so kann sie durch Anwendung von Druck mit Hilfe eines Doppelgebläses entsprechend beschleunigt werden. Das in der Röhre befindliche Wasser lässt man so weit abfließen bis die Oberfläche desselben in die auf der Säule befindliche Watte einzieht, schliesst sodann den Hahn, bringt das Filtrat aus dem Kolben wieder auf die Säule und lässt erneut abtropfen. Sobald die Oberfläche der Flüssigkeit wieder in die Watte eindringt, füllt man frisches Wasser (ca. 20 ml) in die Röhre und perkoliert weiter bis sich im Erlenmeyerkolben 33-35 g Filtrat gesammelt hat. Man fügt 4 ml 25 proz. Ammoniak hinzu und bringt das Gewicht des Filtrates mit Wasser auf 40 g (\pm 0,3 g). Man setzt die Lösung von 0,25 g 1-Fluor-2,4-dinitrobenzol (The British Drug Houses, Smp. 26-28^o) in 30 ml Azeton zu, verschliesst das Kölbchen, schüttelt es eine Minute lang und lässt es dann mindestens 30 Minuten bei Zimmertemperatur und 15 Minuten im Kühlschrank stehen. Statt Fluordinitrobenzol kann auch 1-Chlor-2,4-dinitrobenzol verwendet werden. In diesem Falle lässt man das Kölbchen über Nacht bei Zimmertemperatur und 15 Minuten im Kühlschrank stehen. Der in feinen Nadeln kristallisierende Morphin-dinitrophenyläther wird unter schwachem Saugen in einem tarierten Glasfiltertiegel G 3 mit Hilfe des Filtrates quantitativ gesammelt und 4 mal mit je 2 ml Azeton gewaschen, wobei der Niederschlag jeweils nicht länger als 10-15 Sekunden mit dem Azeton in Berührung sein soll. Es empfiehlt sich, das Filter zum Absaugen der Waschflüssigkeit direkt (ohne Saugflasche) an die Pumpe anzuschliessen. Falls der Niederschlag durch zu starkes Absaugen im Filter festgepresst ist und durch einfaches Schwenken mit dem Azeton nicht genügend gewaschen werden kann, wirbelt man ihn mit einem Glasstäbchen in der Waschflüssigkeit auf. Nach einstündigem Trocknen im Trockenschrank bei 80^o wird der im Exsikkator erkaltete Tiegel gewogen. Den Prozentgehalt des Opiums an Morphin errechnet man nach folgender Formel:

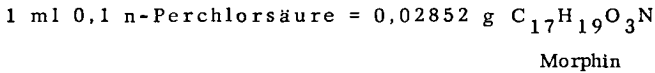
$$\% \text{ Morphin} = \frac{g \times 63,2}{p}$$

g = Gewicht des Niederschlages in g

p = Einwaage Opium in g

Statt durch Wägung kann der abfiltrierte und gewaschene Morphin-dinitrophenyläther auch durch Titration mit 0,1 n-Perchlorsäure in wasserfreiem Medium bestimmt werden. In diesem Falle verwendet man zum Abfiltrieren des Niederschlages mit Vorteil

eine Glassinternutsche IG3 oder ein Allihnsches Rohr 15a G3. Durch längeres Durchsaugen von Luft entfernt man die Reste Waschazeton, löst sodann den Niederschlag im Filter in ungefähr 20 ml wasserfreiem Eisessig, filtriert die Lösung, eventuell unter Anwendung von Druck, direkt in das Titriergefäß und wäscht das Filter 3 mal mit je 5 ml wasserfreiem Eisessig nach. Zur Lösung im Titriergefäß gibt man 5 ml Essigsäureanhydrid und titriert mit 0,1 n-Perchlorsäure gegen Kristallviolett bis zum Farbumschlag von Blau nach Blaugrün oder bestimmt den Endpunkt der Titration auf elektrometrischem Wege.



Diskussion und Ueberprüfung der Methode

Die Extraktion des Morphins aus dem Opium verläuft nach dem angegebenen Verfahren quantitativ. Papierchromatographisch konnten wir in Nachextraktionen der Säule mit Wasser und n-Salzsäure wohl geringe Mengen Nebenalkaloide, hauptsächlich Narkotin, aber in keinem Falle Morphin nachweisen. Die Filtration durch Aluminiumoxyd bewirkt eine kräftige Reinigung des Opiumauszuges, erkennbar an dessen gegenüber einem unbehandelten Wasserauszug viel helleren Farbe und an der Braunfärbung des Aluminiumoxydes. In Tabelle 25 sind die Extraktgehalte von Wasserauszügen verschiedener Opiummuster mit und ohne Filtration durch Aluminiumoxyd einander gegenübergestellt.

Tabelle 25 Extraktgehalt in % von Wasserauszügen mit und ohne Filtration durch Aluminiumoxyd "Woelm sauer"

	Opium I	Opium II	Opium III	Opium IV
unbehandelt	52,8	47,1	64,5	58,9
durch Aluminiumoxyd filtriert	48,1	35,6	49,2	42,0

Um die für eine quantitative Umsetzung von Morphin mit Fluor- bzw. Chlor-dinitrobenzol notwendige Zeit zu ermitteln, haben wir zunächst Versuche mit einer Lösung von reinem Morphinhydrochlorid durchgeführt, deren genauer Gehalt an wasserfreier Morphinbase nach der Opial-Methode der Ph.Helv.V festgestellt wurde. Zu je 10,0 ml dieser Morphinhydrochlorid-Lösung (= 0,1272 g Morphinbase) wurde eine Lösung von 0,25 g Fluor- bzw. Chlor-dinitrobenzol in 30 ml Azeton, 4 ml 25 proz. Ammoniak und 26 ml

Wasser zugegeben. Das Gemisch wurde eine Minute lang geschüttelt und der ausgefallene Morphin-dinitrophenyläther nach verschiedenen Zeiten abfiltriert, 4 mal mit je 2 ml Azeton gewaschen und eine Stunde lang bei 80° getrocknet. Bei Verwendung von Fluor-dinitrobenzol fiel der Morphin-dinitrophenyläther sofort aus, mit Chlor-dinitrobenzol nach wenigen Minuten. Manche Autoren schreiben eine Kühlung des Reaktionsgemisches vor. Wir führten deshalb unsere Versuche in zwei Reihen durch, wobei wir den Morphin-dinitrophenyläther einerseits bei Zimmertemperatur (21°) und andererseits im Kühlschrank (+1°) auskristallisieren liessen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 26 zusammengestellt.

Tabelle 26 Umsetzung von Morphin mit 1-Fluor-2,4-dinitrobenzol bzw. 1-Chlor-2,4-dinitrobenzol

Temp.	Zeit	Morphinbase gefunden mit Fluor-dinitrobenzol	Morphinbase gefunden mit Chlor-dinitrobenzol
21° C	1/4 h	99,8 %	--
	1/2 h	100,0 %	--
	1 h	100,0 %	ca.60 %
	2 h	100,1 %	ca.90 %
	4 h	--	92,4 %
	6 h	--	98,4 %
	12 h	--	100,0 %
1° C	1/4 h	99,4 %	--
	1/2 h	99,8 %	--
	1 h	100,0 %	ca.50 %
	2 h	--	ca.80 %

Aus den in Tabelle 26 angeführten Zahlen ist zu ersehen, dass die Umsetzung von Morphin mit Fluor-dinitrobenzol zu Morphin-dinitrophenyläther bereits nach einer halben Stunde vollständig ist, während bei Verwendung von Chlor-dinitrobenzol eine Fällungszeit von mindestens 12 Stunden eingehalten werden muss. Kühlung des Reaktionsgemisches verzögert die Umsetzung und ist unserer Meinung nach erst nach beendeter Fällung zur Verminderung der Löslichkeit des Morphin-dinitrophenyläthers angebracht. Die Mutterlaugen der unvollständigen Fällungen mit Chlordinitrobenzol wurden über Nacht stehen gelassen und sodann der noch ausgefallene Morphin-dinitrophenyläther bestimmt. Dadurch konnte in allen Fällen der anfangs gefundene Morphinwert auf 100 % ergänzt werden. Bei der Ausfällung des Morphins aus Opiumauszügen musste mit einer eventuellen Fällungshemmung gerechnet werden. Um zu beweisen, dass nach der von uns vorge-

geschlagenen Fällungsdauer von 45 Minuten der gesamte Morphin-dinitrophenyläther ausgefallen ist, filtrierten wir ihn nach verschiedenen längeren Zeiten ab (2 und 4 Stunden). Die gefundenen Morphinwerte waren innerhalb der Fehlergrenze dieselben. In keinem Falle bildete sich in den Mutterlaugen innerhalb der folgenden zwei Tage ein in Azeton unlöslicher Niederschlag und es konnte papierchromatographisch auch kein freies Morphin mehr nachgewiesen werden.

Während der Fällung mit Fluor-dinitrobenzol färbt sich die anfänglich gelbe Lösung allmählich dunkelorange. Nach etwa zwei Stunden setzt sich am Boden ein gelber kristalliner Niederschlag ab, welcher vom mehr voluminösen Morphin-dinitrophenyläther gut zu unterscheiden ist. In Blindversuchen ohne Morphin kann dieselbe Farbänderung und die Bildung desselben kristallinen gelben Niederschlages beobachtet werden. Dieser ist in Wasser unlöslich, schwer in kaltem und etwas besser in heissem Aethanol, dagegen sehr gut löslich in Azeton. Der abfiltrierte, mit Wasser gewaschene und aus Aethanol umkristallisierte Niederschlag wies einen Smp. von $179 - 180^{\circ}$ (korr.) auf. Nach Vermischen mit reinem 2,4-Dinitroanilin ergab sich keine Schmelzpunktsdepression, so dass seine Identität damit feststeht. 2,4-Dinitroanilin entsteht durch Umsetzung von Fluor-dinitrobenzol mit Ammoniak. Mit Chlor-dinitrobenzol färbt sich die anfänglich schwach gelbe Lösung allmählich purpurrot, ein Auskristallisieren von Dinitroanilin konnte auch nach mehrtägigem Stehen nicht beobachtet werden.

Um einen eventuellen Einfluss der im Opium in grösserer Menge vorkommenden Nebenalkaloide auf die Umsetzung des Morphins mit Fluordinitrobenzol festzustellen, fällten wir das Morphin aus Lösungen, welche neben dem Morphin noch je ein Nebenalkaloid enthielten. Zu je 10 ml einer Morphinhydrochloridlösung, deren genauer Gehalt an wasserfreier Morphinbase nach der Opial-Methode der Ph.Helv.V ermittelt wurde, fügten wir eine Lösung von 0,1 g Nebenalkaloid und 0,25 g Fluordinitrobenzol in 30 ml Azeton, 4 ml 25 proz. Ammoniak und 26 ml Wasser hinzu und filtrierten den ausgefallenen Niederschlag nach 45 Minuten ab. In einer weiteren Versuchsreihe bestimmten wir das Morphin in gleicher Weise in einem dem Opial der Ph.Helv.V entsprechenden Gemisch der reinen Alkaloidbasen mit 50,0 % Morphinbase. Die Resultate sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt.

Tabelle 27 Einfluss der Nebenalkaloide auf die Umsetzung von Morphin mit 1-Fluor-2,4-dinitrobenzol

Zugesetztes Alkaloid	Wasserfreie Morphinbase		
	vorgelegt g	gefunden g	gefunden %
0,1 g Codein	0,1272	0,1270	99,9
0,1 g Thebain	0,1272	0,1274	100,1
0,1 g Papaverin	0,1272	0,1278	100,1
0,1 g Narcotin	0,1272	0,1273	100,0
0,1 g Narzein	0,1272	0,1269	99,8
Alkaloidgemisch			
0,3004 g	=0,1502	0,1503	100,0
0,2010 g	=0,1005	0,1006	100,0
0,1007 g	=0,0503	0,0501	99,9

Aus Tabelle 27 ist zu ersehen, dass die in grösserer Menge im Opium vorkommenden Nebenalkaloide die Umsetzung des Morphins mit Fluor-dinitrobenzol nicht beeinflussen, von dem viel weniger reaktionsfreudigen Chlor-dinitrobenzol gilt dasselbe. Dabei ist zu berücksichtigen, dass der Gehalt an Nebenalkaloiden im Opiumauszug nur ein Bruchteil der im eben beschriebenen Versuch zugesetzten 0,1 g beträgt. Dagegen ist es ziemlich sicher, dass die im Opium vorkommenden anderen Phenolbasen mit dem Morphin mitgefällt werden. Nach Small (97) ist deren Gehalt im Opium jedoch so gering, (0,005 %), dass durch sie eine wesentliche Störung nicht zu befürchten ist.

Mannich (71) lässt den durch Umsetzung des Morphins mit Chlor-dinitrobenzol gebildeten und abfiltrierten Niederschlag je zweimal mit 2 ml Azeton und 2 ml Wasser auswaschen, ehe er getrocknet wird. Diese Vorschrift wurde von allen späteren Modifikationen der Mannich-Methode übernommen. Fluor-dinitrobenzol reagiert im Gegensatz zu Chlor-dinitrobenzol auch mit dem zugesetzten Ammoniak unter Bildung von 2,4-Dinitroanilin, welches mit dem Morphindinitrophenyläther abfiltriert wird und daher ein intensiveres Auswaschen des Niederschlages notwendig macht. Garratt und Mitarb. (37) schreiben ein viermaliges Auswaschen mit je 2 ml Azeton vor. Wir überprüften diese Vorschrift und konnten in einer Reihe von Versuchen die Ergebnisse von Garratt und Mitarb. (37) bestätigen. Wir setzten Morphinhydrochlorid in der üblichen Weise mit Fluordinitrobenzol um, filtrierten den Niederschlag nach 45 Minuten ab und wuschen ihn vor dem Trocknen in verschiedener Weise. Die Bestimmung erfolgte durch

Wägung und durch wasserfreie Titration mit Perchlorsäure in Eisessig. Die Ergebnisse sind in folgender Tabelle zusammengestellt.

Tabelle 28 Das Auswaschen des mit Fluordinitrobenzol gebildeten Morphindinitrophenyl-Aethers

Niederschlag ausgewaschen mit	Gewicht des Nieder- schlages (theor. 0,1673) g	Morphindinitrophenyl-Aether	
		gravim. %	titrim. %
---	0,2684	160	119,1
1 x 2 ml Azeton	0,2342	140,1	109,3
2 x 2 ml Azeton	0,2065	123,4	101,2
2 x 2 ml Azeton	0,2097	122,5	101,2
2 x 2 ml Wasser	0,2097	122,5	101,2
3 x 2 ml Azeton	0,1791	107,1	100,3
4 x 2 ml Azeton	0,1674	100,0	99,9

Aus allen von uns untersuchten Opiummustern erhielten wir nach der von uns vorgeschlagenen Methode einen reinen, hellgelben Morphinäther, dessen in mehreren Fällen durchgeführte Bestimmung durch wasserfreie Titration mit Perchlorsäure in Eisessig stets gute Uebereinstimmung mit den gravimetrisch gefundenen Werten ergab.

In der folgenden Tabelle sind die nach der von uns vorgeschlagenen Methode ermittelten Morphingehalte denjenigen der anderen Methoden gegenübergestellt. Wie ersichtlich ist, erhält man mit unserer Methode durchwegs höhere Morphinwerte als mit den Vergleichsmethoden. Die Erklärung dafür sehen wir darin, dass mit der von uns vorgeschlagenen Methode einerseits das gesamte im Opium vorliegende Morphin extrahiert und andererseits auch quantitativ bestimmt wird. Die Methode erfordert ein Minimum an Reagenzien und ist in einem halben Tag gut durchführbar.

Tabelle 29 Morphingehalt in % nach verschiedenen Methoden
(Mittelwerte aus 2-4 Bestimmungen)

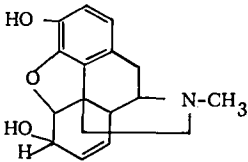
Methode	Opium I	Opium II	Opium III	Opium IV
Ph. Helv. V	10,18	14,36	10,70	15,58
Ph. Int. I	10,15	14,16	10,98	15,61
Brit. Ph. 1958	10,00	14,26		
U. S. P. XV	9,12	13,24		
Svenska F. XI	11,56	14,60	11,22	15,78
Eder u. Wäckerlin	11,66	14,24	11,24	15,89
Knaffl-Lenz	10,67		10,43	
Graf	11,11		9,90	15,70
Mannich	11,87	14,71	11,38	16,00
Garratt u. Mitarb.	11,67	14,64	11,28	16,01
Vorgeschlagene Methode	12,08	14,60	11,90	16,34
	12,12	14,74	11,84	16,29
	12,06	14,68	11,94	16,40
	<u>12,09</u>	<u>14,74</u>	<u>11,89</u>	<u>16,34</u>

3 DIE BESTIMMUNG DER WICHTIGSTEN NEBENALKALOIDE IM OPIUM

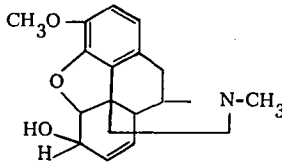
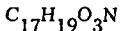
31

ALLGEMEINER TEIL

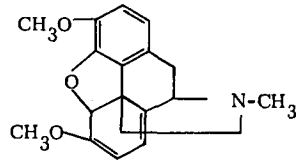
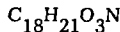
Im Opium sind neben dem Morphin als Hauptalkaloid noch etwa 25 weitere Alkaloide enthalten, die wie das Morphin grösstenteils an Mekonsäure, Milchsäure und Schwefelsäure gebunden sind, teilweise jedoch auch als freie Basen vorliegen und deren Gehalt je nach Herkunft des Opiums sehr verschieden sein kann. Die wichtigsten, d.h. in grösster Menge im Opium vorhandenen Alkaloide sind Morphin, und die Nebenalkaloide Kodein, Thebain, Papaverin und Narkotin.



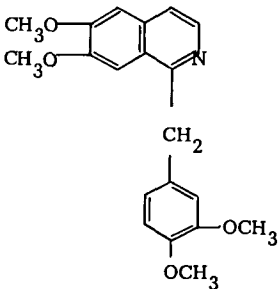
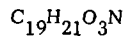
Morphin



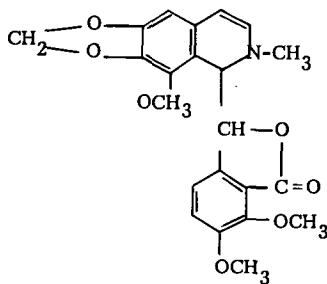
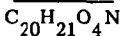
Kodein



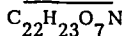
Thebain



Papaverin



Narkotin



Während für die Bestimmung des Morphins eine grosse Zahl von Methoden ausgearbeitet worden ist, gibt es nur sehr wenige für die Bestimmung der wichtigsten Nebenalkaloide. Dies ist verständlich, wenn man an die grossen Schwierigkeiten denkt, die schon der Bestimmung des in verhältnismässig grossen Mengen vorliegenden Morphins entgegenstehen und die noch erheblich grösser werden, wenn es gilt, den oft nur wenige Zehntelprozent betragenden Gehalt der einzelnen Nebenalkaloide zu ermitteln. Da es bisher noch kein Verfahren gibt, welches es gestattet, die einzelnen Alkaloide nebeneinander zu bestimmen, ist eine Auftrennung derselben nicht zu umgehen.

311 Die Trennung der wichtigsten Opiumalkaloide

Die Trennung der Opiumalkaloide, die sowohl für die fabrikmässige Aufarbeitung des Opiums, als auch für die analytische Untersuchung von Bedeutung ist, beruhte bis vor wenigen Jahren fast ausschliesslich auf der unterschiedlichen Löslichkeit und Basizität der einzelnen Alkaloide. Die rein chemischen Eigenschaften der Opiumalkaloide unterscheiden sich voneinander so wenig, dass es nur vereinzelt gelingt, durch chemische Einwirkung auf gewisse Alkaloide Derivate herzustellen, die dann durch verschiedene Eigenschaften getrennt werden können. So können Papaverin und Narkotin auf Grund der unterschiedlichen Löslichkeit ihrer Reineckate getrennt werden (66). Narkotin lässt sich durch Aufspaltung seines Laktoringes in ein wasserlösliches Derivat überführen und so von den wasserunlöslichen Alkaloiden abtrennen (4). Morphin kann mit Chlordinitrobenzol zum Morphindinitrophenyläther umgesetzt werden, welcher im Gegensatz zu den von dieser Umsetzung nicht erfassten Nebenalkaloiden in wässrigem Azeton unlöslich ist (71). Auf Grund seiner phenolischen Hydroxylgruppe unterscheidet sich das Morphin in seiner Löslichkeit ziemlich stark von den nichtphenolischen Nebenalkaloiden, sodass seine Abtrennung durch gewöhnliches Ausschütteln leicht durchgeführt werden kann. Hingegen unterscheiden sich die Nebenalkaloide untereinander in ihrer Löslichkeit nur sehr wenig, weshalb sie durch Ausschütteln allein nicht vollständig getrennt werden können.

Einen wesentlichen Fortschritt brachten die verschiedenen chromatographischen Verfahren. Böhme und Strohecker (20) untersuchten das Verhalten der Opiumalkaloide auf Aluminiumoxydsäulen und konnten eine teilweise Trennung erreichen. Kamp (55) trennte mit Hilfe eines stark sauren Kationenaustauschers und eines stark

basischen Anionenaustauschers die sechs im Opial der Nederl.Ph.V vorliegenden Alkaloide und verwendeten dieses Verfahren auch zur quantitativen Bestimmung dieser Alkaloide im Opium. In ähnlicher Weise trennte Brochmann-Hanssen (22) die Opiumalkaloide mit Hilfe verschiedener Ionenaustauscher. Bettschart (18) führte die Trennung der wichtigsten Opiumalkaloide mittels Verteilungschromatographie durch. Als festen Träger verwendet er Kieselgur und als stationäre Phase Pufferlösungen von verschiedenem pH-Wert. Es gelang ihm die Trennung der Alkaloidpaare Narkotin-Papaverin und Kodein-Thebain, nicht aber die gleichzeitige Auftrennung dieser vier Alkaloide auf einer Säule. Lindblad und Ågren (69) trennten die im Tetrapon enthaltenen Alkaloide Papaverin, Narkotin und Kodein ebenfalls durch Verteilungschromatographie an einer Kieselgursäule, nachdem das Morphin zuvor durch Ausschütteln abgetrennt wurde. In ähnlicher Weise trennte Liang (68) Thebain und Kodein in einer Säule von Kiesel säuregel.

In idealer Weise gelingt die Trennung der Opiumalkaloide mit Hilfe der Papierchromatographie. Eine Zusammenstellung der zahlreichen Arbeiten auf diesem Gebiet geben Büchi und Schumacher (24). Während es vielfach gelang, die wichtigeren Opiumalkaloide durch Verwendung mehrerer Lösungsmittelsysteme oder verschieden gepufferter Papiere zu trennen, war es Büchi und Schumacher (24) vorbehalten, die gleichzeitige Trennung der Alkaloide Morphin, Kodein, Kryptopin, Thebain, Narzein, Papaverin und Narkotin in einem Arbeitsgang auf dem gleichen Chromatogramm durchzuführen.

Das Prinzip der Trennung von Substanzgemischen auf Grund ihrer verschiedenen Wanderungsgeschwindigkeit in einem elektrischen Feld wurde ebenfalls auf die Trennung der Opiumalkaloide angewandt (25, 40, 42, 74, 102, 105).

312 Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Kodein, Thebain, Papaverin und Narkotin

3121 Gravimetrische Verfahren

Die Methoden, welche die aus dem Opium isolierten Alkaloide als Basen gravimetrisch bestimmen, haben sich nicht bewährt, da die Basen selten in so reinem Zustande vorliegen, dass eine Wägung den richtigen Wert vermittelt. Vorteilhafter ist die Bestimmung der Alkaloide in Form von schwerlöslichen Derivaten. Die Opiumalkaloide

unterscheiden sich in ihrem chemischen Verhalten allerdings so wenig, dass sie fast immer alle durch dasselbe Alkaloidfällungsmittel gefällt werden und daher vorher quantitativ getrennt werden müssen. Für die quantitative gravimetrische Bestimmung haben sich in neuerer Zeit Kalignost (Tetraphenylbornatrium) und Reinecke-Salz (Ammonsalz der Tetrahydroxanthron-diaminchrominsäure) bewährt. Mit diesen Reagenzien können die Opiumalkaloide aus essigsaurer Lösung quantitativ gefällt werden (2, 19). Die Bestimmung der Reineckate kann ausser durch Wägung noch kolorimetrisch (18) oder spektrophotometrisch (65) erfolgen.

3122 Titrimetrische Verfahren

Nach Kolthoff (62) lassen sich Basen mit Dissoziationskonstanten $K_B > 10^{-7}$ noch in sehr verdünnter Lösung mit starken Säuren volumetrisch bestimmen. Kodein, Thebain und Morphin können daher mit 0,1 n- bzw. 0,01 n-Salzsäure gegen Methylrot titriert werden, während Narkotin, Papaverin und Narzein einer Titration mit Salzsäure nicht mehr zugänglich sind. Diese Alkaloide verhalten sich dagegen in wasserfreiem Eisessig als so starke Basen, dass sie mit Perchlorsäure titrimetrisch bestimmt werden können (67).

3123 Kolorimetrische und spektrophotometrische Verfahren

Von den vielen bekannten Farbreaktionen der Opiumalkaloide sind nur wenige für eine quantitative Bestimmung geeignet. Kodein und Thebain lassen sich nach der von Wegner (106) beschriebenen Diazoreaktion bestimmen, in der Modifikation von Pfeifer (80) auch nebeneinander Dyer und McBay (30) beschreiben ein spektrophotometrisches Verfahren zur Bestimmung der Opiumalkaloide im ultravioletten, Jernstad (53) sowie Bakre und Mitarb. (15) im infraroten Gebiete. Diese überaus empfindlichen Methoden lassen sich jedoch nicht ohne weiteres auf die Bestimmung der aus Opium isolierten Alkaloide anwenden, da die geringsten Verunreinigungen ernsthafte Störungen verursachen können.

3124 Papierchromatographische Bestimmung

Die Papierchromatographie dient zwar in erster Linie der qualitativen Analyse, sie kann jedoch bei Einhaltung gewisser Bedingungen zu einem quantitativen Verfahren ausgebaut werden (s.S. 19). Asahina und Ono (8) bestimmten die getrennten Opiumalkaloide spektrophotometrisch direkt auf dem Papierchromatogramm. Holubek und

Mitarb. (51) eluierten die papierchromatographisch getrennten Alkaloide Kodein und Narkotin vom Papier und bestimmten sie kolorimetrisch bzw. polarographisch. Miram und Pfeifer (75) trennten die Opiumalkaloide auf verschieden gepuffertem Papier unter Verwendung verschiedener Lösungsmittelsysteme, stellten von dem angefärbten Papierchromatogramm ein Filmnegativ her und bestimmten die Konzentration der Alkaloide mittels einer photoelektrischen Methode.

32

EXPERIMENTELLER TEIL

321 Ueberprüfung der bisherigen Methoden zur Bestimmung der wichtigsten Nebenalkaloide im Opium

Die bis zum Jahre 1946 bekanntgewordenen Verfahren zur Bestimmung der Nebenalkaloide im Opium sind von Wydler (108) zusammengestellt worden. Wir geben im Folgenden daher nur einen Ueberblick über die seit diesem Zeitpunkt veröffentlichten Methoden.

Methode von Liang (68)

3 g Opium werden mit der zehnfachen Menge 0,1 n-Schwefelsäure durch einfache Mazeration extrahiert, ein aliquoter Teil des Extraktes mit Natronlauge versetzt und in einem Extraktionsapparat mit Aether extrahiert. Der Aetherextrakt enthält die nichtphenolischen Nebenalkaloide. Papaverin und Narkotin werden als Azetate gefällt und nach Ueberführung des Narkotins in ein wasserlösliches Derivat (Laktenspaltung) voneinander getrennt. Kodein und Thebain werden durch Säulenverteilungschromatographie getrennt. Die isolierten Alkaloide werden als Basen gravimetrisch bestimmt.

Papierchromatographisch stellten wir fest, dass durch die einmalige Mazeration des Opiums mit 0,1 n-Schwefelsäure nicht alle Alkaloide extrahiert werden. Im Opiumrückstand fanden wir noch nennenswerte Mengen Narkotin, woraus wir schliessen, dass 0,1 n-Schwefelsäure nicht genügt, um das im Opium als Base vorliegende schwach basische Narkotin vollständig zu lösen. Eine weitere Fehlerquelle sehen wir in der starken Korrektur der Volumensvergrößerung des Opiumauszuges durch die Feuchtigkeit des Opiums und die in den Auszug gehenden Extraktstoffe. In Versuchen mit reinen Alkaloiden stellten wir ferner fest, dass die Fällung des Papaverins und Narkotins nicht quantitativ verläuft und die in der Mutterlauge verbleibenden Reste dieser Alkaloide bei der verteilungschromatographischen Trennung von Kodein und Thebain in der Kodeinfraktion erscheinen. Papaverin und Narkotin werden quantitativ getrennt.

Methode des Sekretariates der Vereingten Nationen (94)

4,5 g Opium werden zunächst mit konzentrierter und dann verdünnter Essigsäure mazeriert. Ein aliquoter Teil des Opiumauszuges wird mit Chloroform ausgeschüttelt und dadurch Thebain, Papaverin und Narkotin extrahiert. Thebain wird durch Ausschütteln der Chloroformlösung mit verdünnter Schwefelsäure abgetrennt. Narkotin wird durch Öffnung seines Laktanringes in ein wasserlösliches Derivat überführt und als solches vom Papaverin abgetrennt. Die im sauren Opiumauszug zurückgebliebenen Alkaloide Morphin und Kodein werden durch kontinuierliche Extraktion des ammoniakalisch gemachten Auszuges mit Chloroform/Isopropanol 3:1 extrahiert und durch Ausschütteln getrennt. Die isolierten Alkaloide werden als Basen gravimetrisch bestimmt.

Durch Mazeration mit Eisessig wird nahezu das gesamte Opium in Lösung gebracht. Die Isolierung der Alkaloide von den vielen nichtalkaloidischen Begleitstoffen gestaltet sich daher ziemlich schwierig und erfordert eine Unzahl von Ausschüttelungen und sonstigen Operationen, sodass zur Durchführung einer Analyse mehrere Arbeitstage notwendig sind.

Methode von Kamp (55)

1 g Opium wird mit 100 ml 0,1 n-Salzsäure extrahiert und der Auszug durch eine Säule mit dem stark sauren Kationenaustauscher IMAC-C 22 oder Dowex 50 geleitet. Die Säule wird mit Wasser nachgewaschen, das Wasser durch Alkohol verdrängt und Morphin und Narzein mit 100 ml wässrigem n-Ammoniak eluiert. Diese beiden Alkaloide werden auf einer zweiten Säule mit dem stark basischen Anionenaustauscher Amberlite IRA-400 getrennt. Mit einer zweiten Fraktion n-Ammoniak wird Kodein eluiert und schliesslich mit alkoholischem Ammoniak die Alkaloide Papaverin, Narkotin und Thebain. Diese werden noch einmal an den Kationenaustauscher IMAC-C 22 oder Dowex 50 gebunden und fraktioniert eluiert.

Der Autor gibt keine genaue Vorschrift zur Herstellung des salzsauren Opiumauszuges. Wir extrahierten das Opium daher durch wiederholte Mazeration, wodurch die gesamten Alkaloide erfasst werden. Den dunkelbraunen Opiumauszug filterten wir durch eine Säule von 20 ml Dowex 50 H⁺ (X-2, Körngrösse 100-200 mesh). in dem nahezu farblosen Filtrat konnten wir keine Alkaloide nachweisen, sie werden demnach vom Austauscher quantitativ gebunden, jedoch gemeinsam mit den Ballaststoffen. Diese können durch Nachwaschen der Säule mit Wasser und Alkohol nur teilweise entfernt werden, der grössere Teil wird zugleich mit den Alkaloiden eluiert. Sämtliche Alkaloidfraktionen sind stark gefärbt. Es gelang uns nicht, durch das angegebene Verfahren die Alkaloide quantitativ zu trennen. Die Morphinfraktion enthielt bereits kleine Mengen Kodein und die Kodeinfraktion noch Morphin. Thebain und Papaverin waren mit Narkotin verunreinigt. Quantitativ getrennt werden konnte Morphin und Narzein. Als Nachteil betrachten wir die Vorschrift, dass sowohl die alkoholischen als auch die wässrigen Fraktionen wiederholt zur Trockene eingedampft werden müssen. Besonders im Eindampfen

der ammoniakalischen Morphinfraktion sehen wir eine ernste Fehlerquelle, da Morphin in ammoniakalischer Lösung schon beim Stehen an der Luft teilweise oxydativ zersetzt wird (28). Dieser Fehler könnte durch Ausschütteln der Alkaloide aus der wässrigen Phase durch geeignete organische Lösungsmittel leicht vermieden werden. Diese Operation ist, wie wir bei unseren Versuchen feststellen konnten, mit einer Reinigung der Alkaloide verbunden, da ein Teil der gefärbten Ballaststoffe beim Ausschütteln in der wässrigen Phase bleibt.

Die Methoden von Asahina und Ono (8), Pfeifer (80) sowie Miram und Pfeifer (75) haben die quantitative Erfassung der wichtigsten Mohnalkaloide im Mikromasstabe zum Ziel. Sie sind ohne Zweifel sehr wertvoll für genetische Untersuchungen, da es mit ihnen möglich ist, den Alkaloidgehalt in einzelnen Teilen der Mohnpflanze zu ermitteln. Für die Gehaltsbestimmung des Opiums im Apothekerlaboratorium sind sie dagegen weniger geeignet und wohl auch nicht bestimmt, da sie wegen der geringen Einwaage an Opium beträchtliche analytische Erfahrung und das Vorhandensein von besonderen Messgeräten voraussetzen.

Zu erwähnen sind noch Verfahren, welche die quantitative Bestimmung eines einzelnen oder einiger Nebenalkaloide im Opium bezwecken. Kodein (7, 9, 79), Thebain und Papaverin (93), Thebain, Papaverin und Narkotin (15), Narkotin (95), Narkotin und Mekonsäure (76).

322 Eine neue Methode zur Bestimmung von Kodein, Thebain, Papaverin und Narkotin im Opium

Reagenzien: Salzsäure, 25 proz.
Natronlauge, 30 proz.
Eisessig
Aether
Benzol
Chloroform
Ammoniak, 25 proz.
Phosphorsäure, konz.
Aluminiumoxyd "Woelm sauer"
Kieselgur "Hyflo Super-Cel", Firma Johns-Manville, London
Reineckesalz z.A. Merck
Perchlorsäure, 0,1 n
Silbernitratlösung, 0,1 n
Ammonrhodanidlösung, 0,1 n

Wo andere Angaben fehlen, sollen die Reagenzien den Anforderungen der Ph. Helv.V entsprechen. Benzol des Handels soll vor Gebrauch destilliert werden. Die Reineckesalz-Lösung wird wie folgt bereitet: 2 g Reineckesalz z.A. Merck werden mit 50 ml dest. Wasser 10 Minuten lang geschüttelt und die Lösung durch ein hartes Papierfilter filtriert.

Geräte: Extraktionsapparat zum Extrahieren einer schweren Flüssigkeit mit einem leichteren Lösungsmittel.
2 Chromatographieröhren: 20-30 cm lange Glasrohre, 1,5-2 cm Durchmesser, mit Glashahn im verengten Teil.

Arbeitsvorschrift

1 g pulverisiertes Opium (auf drei Dezimalen genau gewogen) wird in einer Reibschale mit 2 ml n-Salzsäure zu einem möglichst homogenen Brei verrieben und dieser mit so viel (5-7 g) Aluminiumoxyd "Woelm sauer" sorgfältig vermischt, bis ein leicht fließendes Pulver entstanden ist. In den verengten Teil einer Chromatographieröhre über dem Hahn wird ein Wattebausch gebracht und die Röhre etwa zur Hälfte mit 0,1 n-Salzsäure gefüllt. Auf die Oberfläche der Salzsäure lässt man in dünnem Strahl 5 g Aluminiumoxyd "Woelm sauer" niederrieseln und sich absetzen. Eventuell eingeschlossene Luftblasen werden durch Aufwirbeln des Aluminiumoxydes mit einem Glasstab ausgetrieben. Die in der Röhre befindliche Flüssigkeit lässt man bis auf etwa 3 cm über dem Aluminiumoxyd ablaufen, füllt sodann die Opium/Aluminiumoxyd-Anreicherung in die Röhre ein und schlämmt sie in der dort befindlichen Flüssigkeit durch Umrühren mit einem Glasstabe auf. Die Reste der Opiumverreibung in der Reibschale und am Pistill wischt man mit einem befeuchteten Wattebausch ab, bringt auch diesen in das Rohr und presst ihn mit Hilfe eines Glasstabes mit mässigem Druck auf die Säule. Beim Hinunterschieben der Watte achtet man darauf, dass das an der Innenwand des Rohres haftende Opium und Aluminiumoxyd von der Watte mitgenommen wird. Unter die Röhre stellt man sodann einen Erlenmeyerkolben und öffnet den Hahn der Röhre so weit, dass 4-5 ml Filtrat/Minute erhalten werden. Verläuft die Perkolation zu langsam, so kann sie durch Anwendung von Druck beschleunigt werden. Die in der Säule befindliche Flüssigkeit lässt man so weit ablaufen, bis die Oberfläche derselben in die auf der Säule befindliche Watte eindringt, füllt 20-30 ml frische 0,1 n-Salzsäure in die Röhre und lässt wieder ablaufen, bis die Oberfläche der Flüssigkeit wieder in die Watte eindringt. Dieser Vorgang wird so oft wiederholt, bis sich im Erlenmeyerkolben annähernd 100 ml Filtrat gesammelt hat. Dieses wird mit 3 ml 30 proz. Natronlauge versetzt, quantitativ in den Extraktionsapparat (Kutscher-Stuedel) überführt und 2-3 Stunden lang mit peroxydfreiem

Aether extrahiert. Die Vollständigkeit der Extraktion wird überprüft, indem man 10 Tropfen von dem aus dem Extraktionsapparat in den Siedekolben zurückfließenden Aether auf einem Uhrglas eindunstet und sodann einen Tropfen konz. Phosphorsäure auf das Uhrglas gibt. Falls sich diese nicht gelb oder braun färbt (Abwesenheit von Kodein und Thebain), kann die Extraktion abgebrochen werden, andernfalls wird weiter extrahiert, bis ein neuerlicher Farbttest negativ ausfällt. Die im Extraktionsapparat befindliche Flüssigkeit (aber ohne den im Siedekolben befindlichen Aether) wird in einen Scheidetrichter überführt, der Extraktionsapparat mit wenig Wasser nachgespült und sodann die beiden Phasen im Scheidetrichter getrennt. Zu der im Scheidetrichter zurückbleibenden Aetherphase fügt man den im Siedekolben befindlichen Aether und schüttelt ihn mit 10 ml 0,1 n-Natronlauge und hierauf zweimal mit je 10 ml Wasser. Die wässrig-alkalischen Phasen werden in einem zweiten Scheidetrichter gesammelt und mit 20 ml frischem Aether ausgeschüttelt. Die wässrige Phase fügt man zum Opiumauszug, die Aetherphasen in den beiden Scheidetrichtern werden in einem Rundkolben vereinigt und das Lösungsmittel abdestilliert. Der Rückstand wird unter gelindem Erwärmen in 2 ml Benzol gelöst. Zur erkalteten Lösung fügt man 6 ml Aether und bringt diese Lösung quantitativ auf die nachfolgend beschriebene Kieselgursäule.

In den verengten Teil einer Chromatographieröhre über dem Hahn wird ein Wattebausch gebracht und die Röhre etwa 8 cm hoch mit mobiler Phase I (Aether/Benzol 3:1, wassergesättigt) gefüllt. 15 g Kieselgur (Hyflo-Super-Cel, Firma Johns-Manville Co., London) werden in einer Reibschale sorgfältig mit 13 ml Mc Ilvain Puffer pH 4,8 verrieben und die Verreibung in kleinen Portionen in die Chromatographieröhre gebracht und mit Hilfe eines mit einer perforierten Scheibe versehenen Ladestockes möglichst gleichmässig festgepresst. Die in der Röhre befindliche Flüssigkeit wird sodann bis auf wenige mm über der Oberfläche des Kieselgurs abgelassen, dann die Lösung der Alkaloide vorsichtig in das Rohr gefüllt und in die Säule eindringen gelassen. Der Kolben und die Innenwand des Rohres werden dreimal mit je 3 ml mobiler Phase I nachgespült. Zwischen jeder Spülung lässt man die Flüssigkeit gerade in die Säule eindringen, vermeidet aber, dass die Säule trockenläuft. Man perkoliert sodann mit weiteren Mengen mobiler Phase I, indem man mit Vorteil das Lösungsmittelgemisch aus einem über der Chromatographieröhre befestigten Tropftrichter kontinuierlich nachfließen lässt. Das Eluat wird in einem Messzylinder aufgefangen. Die Durchflussgeschwindigkeit wird so reguliert, dass etwa 2 ml Eluat/Minute erhalten werden. Meist ist dazu leichter Ueberdruck notwendig. Die ersten 100 ml Eluat, welche das Narkotin und Papaverin enthalten, werden,

nachdem die an der unteren Mündung des Chromatographierohres auskristallisierten Alkaloidmengen mit wenig Benzol abgespült wurden, in einen Rundkolben überführt und das Lösungsmittel abdestilliert (Fraktion I).

Zur Elution des Thebains sind je nach Opiummuster 150-250 ml mobiler Phase I notwendig. Die Vollständigkeit der Elution dieses Alkaloides wird überprüft, indem 10 Tropfen des Eluates auf einem Uhrglas eingedunstet werden und der Rückstand mit 1 Tropfen konz. Phosphorsäure versetzt wird (Thebain = Gelbfärbung). Das Lösungsmittel wird abdestilliert, der Rückstand in 5 ml 2 n-Essigsäure gelöst und mit weiteren 5 ml 2 n-Essigsäure quantitativ in ein kleines Bechergläschen überführt. Die Lösung wird mit so viel frisch bereiteter Reineckesalz-Lösung (5-10 ml) versetzt, dass die über dem Niederschlag stehende Flüssigkeit rot gefärbt bleibt. Das Bechergläschen wird während 30 Minuten in ein Eisbad oder in den Kühlschrank (0 bis +1^o) gestellt, der Niederschlag sodann in einem kleinen Glassinterfilter (sehr gut eignen sich 4-5 cm über der Filterplatte abgeschnittene Allihn'sche Rohre 15a G4) abfiltriert und mit kleinen Portionen Eiswasser gewaschen, bis das Filtrat farblos abläuft (2-3 mal 3 ml). Die Bestimmung erfolgt nach einer der weiter unten angegebenen gravimetrischen oder titrimetrischen Methode.

Kodein wird mit 150 ml mobiler Phase II (Chloroform des Handels mit 1 % Aethanol, ammoniakgesättigt) eluiert. Das Lösungsmittel wird abdestilliert und der Rückstand in gleicher Weise wie bei Thebain angegeben behandelt.

Der nach dem Abdestillieren von Fraktion I im Kolben verbleibende Rückstand (Narkotin und Papaverin) wird in 5 ml Aethanol gelöst, mit 5 ml 2 n-Natronlauge versetzt und 5 Minuten lang auf dem siedenden Wasserbad erwärmt. Die erkaltete Lösung wird unter Nachspülen mit 15 ml Wasser quantitativ in einen Scheidetrichter überführt und dreimal mit je 30 ml Aether ausgeschüttelt. Die vereinigten Aetherphasen werden mit 10 ml 0,1 n-Natronlauge und zweimal mit je 10 ml Wasser geschüttelt, in ein Kölbchen überführt und der Aether abdestilliert. Der Rückstand (Papaverin) wird in gleicher Weise wie bei Thebain angegeben behandelt. Die wässrig-alkalischen Phasen werden in einem Erlenmeyerkölbchen vereinigt, mit 25 proz. Salzsäure neutralisiert, mit weitem 4 ml dieser Säure versetzt und 30 Minuten lang auf dem siedenden Wasserbad erwärmt. Die erkaltete Lösung wird quantitativ in einen Scheidetrichter überführt, mit konz. Ammoniak alkalisch gemacht und dreimal mit je 30 ml Aether ausgeschüttelt. Die vereinigten Aetherphasen werden mit 10 ml Wasser ausgeschüttelt, nach Trennung der

Schichten die wässrige Phase verworfen und die Aetherphase in ein Kölbchen abgelassen und der Aether abdestilliert. Das zurückbleibende Narkotin wird nach kurzem Trocknen im Trockenschrank bei 103-105° in 30 ml Eisessig (mit 5 % Essigsäureanhydrid) gelöst und mit 0,1 n-Perchlorsäure in Eisessig titriert.

$$1 \text{ ml } 0,1 \text{ n-Perchlorsäure} = 0,041341 \text{ g } C_{22}H_{23}O_7N \text{ (Narkotin)}$$

Narkotin kann auch in der bei Thebain angegebenen Weise als Reineckat gefällt und nach einer der folgenden Methoden bestimmt werden. Wegen der grösseren Menge empfiehlt es sich, nur einen aliquoten Teil des anfallenden Narkotins (1/4 - 1/2) als Reineckat zu fällen.

Gravimetrische Bestimmung der Alkaloidreineckate

Die abfiltrierten und gewaschenen Alkaloidreineckate werden im Trockenschrank bei 100° eine Stunde lang getrocknet. Narkotin-Reineckat muss zuerst bei einer 50° nicht übersteigenden Temperatur vorgetrocknet werden, da es sonst zersetzt wird. Den Alkaloidgehalt des Opiums errechnet man nach folgender Formel:

$$\% \text{ Alkaloidbase} = \frac{g \times f}{p}$$

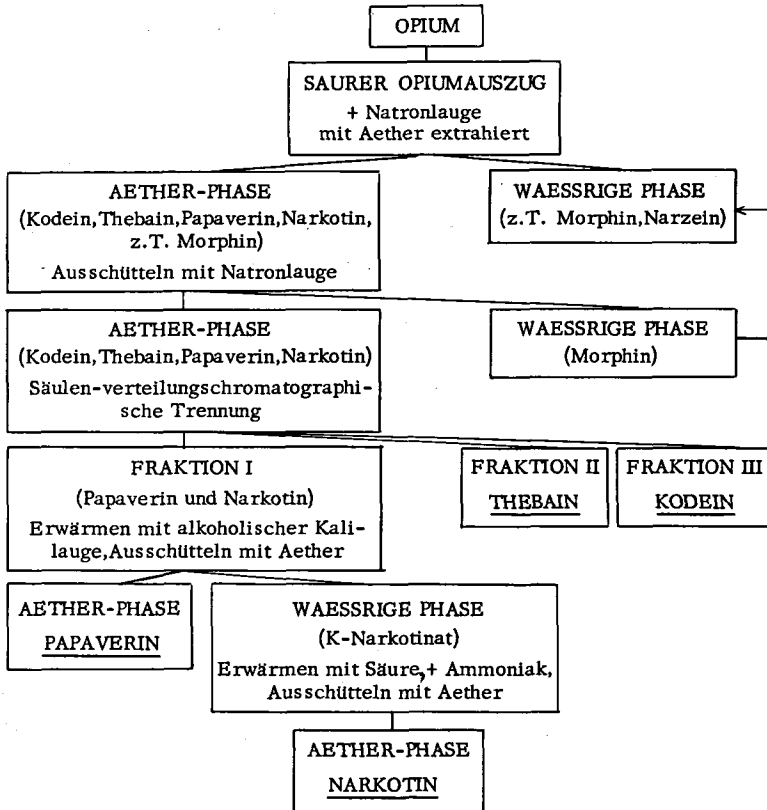
- g = Gewicht des getrockneten Niederschlages in g
- p = Gewicht des eingewogenen Opiums in g
- f = Umrechnungsfaktor Reineckat zu Alkaloidbase
 - = 48,37 für Kodeinbase
 - = 49,35 für Thebainbase
 - = 51,51 für Papaverinbase
 - = 56,41 für Narkotinbase

Titrimetrische Bestimmung der Alkaloidreineckate

Die abfiltrierten und gewaschenen Alkaloidreineckate werden durch Durchsaugen von Luft vom anhaftenden Wasser befreit, in 2-3 ml Azeton gelöst und quantitativ in einen 200 ml fassenden Erlenmeyerkolben überführt. Mit Vorteil wird die Lösung des Reineckates im Filter durch Anwendung von Druck direkt in das Titriergefäss filtriert und das Filter zweimal mit 2-3 ml Azeton nachgespült. Die Lösung wird mit 40 ml Wasser und 2 ml alkalischer Seignettesalz-Lösung (Fehling II) versetzt und 10 Minuten lang gekocht. Zur wieder erkalteten Lösung fügt man 20 ml 25 proz. Salpetersäure und 10 ml 0,1 n-Silbernitratlösung (genau gemessen) hinzu und titriert den Ueberschuss an Silbernitrat mit 0,1 n-Ammonrhodanidlösung unter Verwendung von Ferriammonsulfat als Indikator zurück.

1 ml 0,1 n-AgNO₃ = 0,00748 g C₁₈H₂₁O₃N (Kodeinbase)
= 0,00778 g C₁₉H₂₁O₃N (Thebainbase)
= 0,00848 g C₂₀H₂₁O₄N (Papaverinbase)
= 0,01033 g C₂₂H₂₃O₇N (Narkotinbase)

Schema der Methode zur Bestimmung von Kodein, Thebain, Papaverin und Narkotin im Opium



Die getrennten Alkaloide werden als Reineckate gravimetrisch oder titrimetrisch bestimmt.

3221 Diskussion und Ueberprüfung der Methode

32211 Die Extraktion der Alkaloide aus dem Opium

Für die Extraktion der Gesamtalkaloide aus dem Opium stehen im Gegensatz zur Extraktion des Morphins allein lediglich zwei Möglichkeiten offen: die Extraktion mit Säuren und die Extraktion mit organischen Lösungsmitteln. Mit beiden Methoden ist es unter geeigneten Bedingungen möglich, die gesamten Alkaloide zu extrahieren; beide Verfahren haben aber den Nachteil, dass neben den Alkaloiden noch grosse Mengen an nichtalkaloidischen Begleitstoffen, vor allem Farbstoffe, mitextrahiert werden. Bei der Extraktion mit Säure steigt der Extraktgehalt des Auszuges mit der Konzentration der verwendeten Säure. Mit hochkonzentrierten Säuren kann nahezu das gesamte Opium in Lösung gebracht werden, es ist dabei jedoch mit einer teilweisen Zersetzung gewisser Alkaloide (Thebain) zu rechnen. Sehr verdünnte Säuren sind andererseits nicht imstande, die Alkaloidbasen aus schwerlöslichen Verbindungen mit Pflanzenstoffen, wie sie z.T. im Opium vorliegen, herauszuspalten und die schwach basischen Alkaloide quantitativ in Lösung zu bringen. Unsere Versuche haben gezeigt, dass bei der Extraktion des Opiums mit der zehnfachen Menge 0,1 n-Salzsäure durch einfache Mazeration, wie sie von manchen Autoren vorgeschrieben wird (68), die in grösserer Menge vorliegenden Alkaloide Morphin und Narkotin nicht vollständig in Lösung gehen, hingegen ist durch wiederholte Mazeration eine quantitative Extraktion möglich. Um bereits bei der ersten Mazeration die Alkaloide möglichst vollständig in Lösung zu bringen, verreiben wir das Opium zunächst mit einer geringen Menge n-Salzsäure, wodurch die Alkaloidverbindungen mit den Pflanzenstoffen gespalten werden, das säureempfindliche Thebain jedoch noch nicht angegriffen wird, und vervollständigen die Extraktion durch weitere Mazerationen mit 0,1 n-Salzsäure. Bei der Behandlung des Opiums mit Säure ballen sich, besonders bei indischen Opiumsorten, die Opiumteilchen zu klebrigen Klumpen zusammen, wodurch die Auswaschung der Alkaloide erschwert wird und die Poren der Glassinterfilter verstopft werden. Diese Schwierigkeit konnten wir durch Verreiben des Opiums mit saurem Aluminiumoxyd und Durchführung der Extraktion in Form einer Perkolation umgehen. Papierchromatographisch konnten wir nachweisen, dass durch das angegebene Verfahren sämtliche Alkaloide extrahiert werden.

32212 Die Isolierung der Alkaloide

Unsere Versuche, die Alkaloide aus dem dunkelbraun gefärbten, ballaststoffreichen sauren Opiumauszug mit Hilfe des Ionenaustausches zu isolieren, führten nicht zum

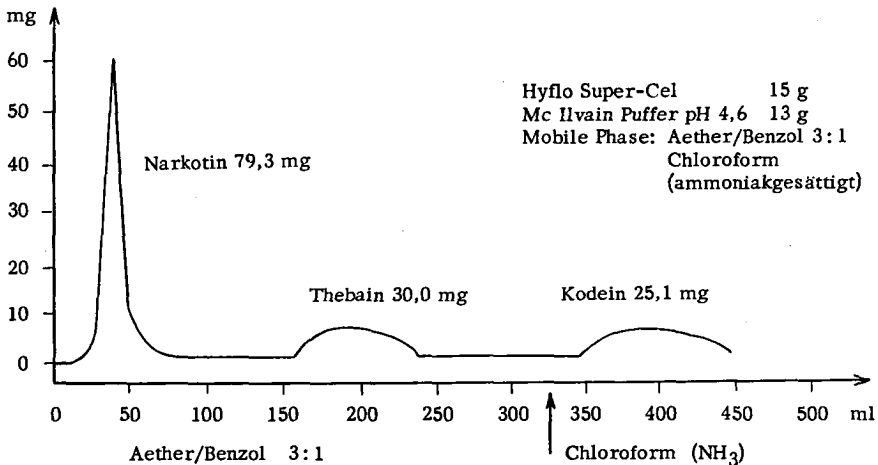
Ziele, da es uns zwar gelang, die Alkaloide quantitativ an einen stark sauren Kationenaustauscher (Dowex 50) zu binden, nicht aber, sie von den gleichzeitig gebundenen gefärbten Ballaststoffen zu trennen. Wir wandten uns daher der direkten Extraktion des Opiumauszuges mit organischen Lösungsmitteln zu. Gewöhnliches Ausschütteln erwies sich als nicht geeignet, da der alkalisierte Opiumauszug mit allen versuchten Lösungsmitteln und Gemischen beim Schütteln starke Emulsionen bildete, welche sich z.T. überhaupt nicht trennen liessen. Diese Versuche zeigten, dass Aether gegenüber anderen Lösungsmitteln wenig nichtalkaloidische Ballaststoffe aus der wässrigen Phase aufnimmt. Aether hat ferner den Vorteil, dass Morphin darin sehr schwer löslich ist, während sich die vier wichtigsten Nebenalkaloide leicht lösen. Es gelang uns jedoch auch mit Aether nicht, die Emulsionsbildung, besonders bei indischen Opiumsorten, völlig zu vermeiden, weshalb wir die Extraktion in einem Apparat für kontinuierliche Extraktion (Kutscher-Steudel) durchführen. Dieses Verfahren erfordert wohl mehr Zeit als gewöhnliches Ausschütteln, der Apparat bedarf während der Extraktionszeit jedoch kaum irgendwelcher *Wartung und vor allem ist die Gefahr der Emulsionsbildung vollkommen ausgeschaltet*. Die Extraktion ist nach 2-3 Stunden vollständig und liefert einen nahezu farblosen Auszug. Die papierchromatographische Analyse zeigte, dass lediglich geringe Mengen Morphin mit den nichtphenolischen Nebenalkaloiden mitextrahiert werden. Das Morphin kann durch Ausschütteln mit verd. Natronlauge aus dem Aetherextrakt entfernt werden. Dabei gehen, wie die papierchromatographische Ueberprüfung ergab, geringe Mengen Kodein mit in die Natronlauge. Diese können mit Aether zurückgeschüttelt werden, wobei das Morphin vollständig in der Natronlauge verbleibt.

32213 Die Trennung der Alkaloide

Auf Grund der geringen Unterschiede im chemischen und physikalischen Verhalten der vier zu trennenden Alkaloide Kodein, Thebain, Papaverin und Narkotin schien uns ein chromatographisches Verfahren die grösste Aussicht auf Erfolg zu haben. Richtungsweisend für unsere Versuche waren die Arbeiten von *Bettschart* (18), sowie *Lindblad* und *Ågren* (69). Ersterer trennte die eben erwähnten vier Alkaloide in Mengen von ca. je 10 mg an zwei mit Pufferlösung als stationäre Phase imprägnierten Kieselgursäulen. Wir strebten mit Rücksicht auf eine spätere titrimetrische Bestimmung die *Auftrennung grösserer Alkaloidmengen an und mussten dazu die von Bettschart* (18) für kleine Alkaloidmengen vorgeschriebenen Bedingungen modifizieren. Wie aus untenstehendem Diagramm hervorgeht, können die Alkaloide Narkotin, Thebain und Kodein

durch Säulenverteilungschromatographie unter den von uns vorgeschlagenen Bedingungen getrennt werden und zwar in grösseren Mengen, als sie durchschnittlich in 1 g Opium vorliegen. Papaverin verhält sich unter den angegebenen Bedingungen gleich wie Narkotin und wird gemeinsam mit diesem eluiert. Von einer chromatographischen Trennung dieser beiden Alkaloide auf einer zweiten Säule haben wir Abstand genommen, da die Trennung schnell und besonders bei wechselnden Mengen zuverlässiger in chemischer Weise erfolgen kann.

Diagramm I
Trennung von Narkotin, Thebain und Kodein



Die Eluate wurden in Fraktionen zu je 10 ml aufgefangen, das Lösungsmittel abdestilliert und der Rückstand nach Trocknung durch wasserfreie Titration mit 0,01 n-Perchlorsäure in Eisessig bestimmt. In qualitativer Hinsicht wurde die Trennung papierchromatographisch kontrolliert.

32214 Die Bestimmung der Alkaloide

Die Ueberführung der aus dem Opium isolierten Alkaloide in die entsprechenden Reineckate hat den Vorteil, dass die Bestimmung in verschiedener Weise vorgenommen und den jeweiligen Verhältnissen angepasst werden kann. Durch die Salzbildung mit

Reineckesäure wird das Molekulargewicht der Opiumalkaloide annähernd verdoppelt, was sich für die gravimetrische Bestimmung günstig auswirkt. Nach Hydrolyse des Reineckesalzes entsprechen einem Äquivalent Alkaloidbase vier Äquivalente Rhodanid, sodass sehr kleine Mengen durch argentometrische Titration bestimmt werden können. Um die Zuverlässigkeit dieser Bestimmungsweise zu überprüfen, haben wir eine Reihe von Analysen mit eingewogenen Mengen von Reinalkaloiden durchgeführt. Die in angegebener Weise gefällten, abfiltrierten und gewaschenen Reineckate wurden zunächst getrocknet und gewogen, sodann vom Filter gelöst und titrimetrisch bestimmt.

Tabelle 30 Gravimetrische und titrimetrische Bestimmung von Opiumalkaloiden mit Reinecke-Salz

Alkaloid	vorgelegt mg	gefunden	
		gravimetrisch mg	titrimetrisch mg
Kodein	15,3	15,0	15,1
	28,7	28,2	28,9
	35,4	34,9	35,0
Thebain	12,8	12,0	12,2
	24,7	24,1	25,0
	33,6	33,1	32,9
Papaverin	17,2	16,8	17,2
	29,4	28,8	29,0
	37,3	36,7	36,7
Narkotin	17,0	16,8	16,8
	26,9	26,3	26,4
	40,1	39,6	39,9

32215 Die Ueberprüfung der Methode mit reinen Alkaloiden

Die Zuverlässigkeit der Methode haben wir in einer Reihe von Versuchen mit reinen Alkaloiden überprüft, indem wir selbst hergestellte Alkaloidgemische in derselben Weise wie für Opium angegeben behandelten. Narkotin wurde nach erfolgter Abtrennung durch wasserfreie Titration mit 0,1 n-Perchlorsäure in Eisessig bestimmt, Papaverin, Thebain und Kodein wurden als Reineckate gefällt und titrimetrisch bestimmt.

Tabelle 31 Trennung und Bestimmung von Kodein, Thebain, Papaverin und Narkotin

Kodein		Thebain		Papaverin		Narkotin	
vorgelegt mg	gefunden mg	vorgelegt mg	gefunden mg	vorgelegt mg	gefunden mg	vorgelegt mg	gefunden mg
31,2	29,9	33,4	32,0	29,8	30,0	68,4	67,8
24,7	23,0	29,4	28,1	22,4	23,0	57,3	56,8
19,5	19,0	23,4	22,5	19,9	19,1	60,0	59,4

Tabelle 32 Gehalt in % von verschiedenen Opiummustern an Kodein, Thebain, Papaverin und Narkotin nach der vorgeschlagenen Methode, sowie Vergleichswerte nach anderen Verfahren

	Kodein	Thebain	Papaverin	Narkotin
Opium I	2,85	1,95	0,7	7,9
	2,85	1,80	0,6	7,7
Mittelwert	<u>2,85</u>	<u>1,87</u>	<u>0,65</u>	<u>7,8</u>
Vergleichswerte	2,63+)	1,50+)	0,69+)	7,6')
Opium III	2,49	2,71	2,62	9,40
	2,30	2,60	2,82	8,73
	2,20	2,80	2,78	9,20
Mittelwert	<u>2,33</u>	<u>2,70</u>	<u>2,74</u>	<u>9,11</u>
Vergleichswerte	2,16+) 2,74')	2,37+) 3,0 ')	2,16+) 2,46')	9,12')
Opium IV	1,30	1,23	2,91	5,53
	1,05	1,18	2,73	5,41
	1,30	1,45	2,95	5,66
Mittelwert	<u>1,22</u>	<u>1,29</u>	<u>2,87</u>	<u>5,53</u>
Vergleichswerte	1,24+) 1,56')	0,92+) 1,38')	1,99+) 2,93')	5,38')

+) United Nations Document ST/SOA/SER.K/31

') United Nations Document ST/SOA/SER.K/34

Wie aus obenstehender Tabelle hervorgeht, werden nach dem von uns vorgeschlagenen Verfahren ähnliche Resultate erhalten wie mit den Vergleichsmethoden. Diesen Ausschüttelungen und den meisten anderen Verfahren gegenüber hat unsere Methode den Vorteil, dass wesentlich weniger Einzeloperationen erforderlich sind und vor allem jede Ausschüttelung des ballaststoffreichen Opiumauszuges vermieden wird.

Eine Analyse kann mit den in jedem analytischen Laboratorium vorhandenen Reagenzien und Geräten innerhalb eines Tages ausgeführt werden. Trotz der geringen Einwaage von 1 g Opium können die vier Alkaloide auf Grund der Molekülvergrößerung bzw. Erhöhung der Wertigkeit durch die Salzbildung mit Reinecke-Säure gravimetrisch, bzw. titrimetrisch mit grosser Genauigkeit und guter Reproduzierbarkeit bestimmt werden.

4

ZUSAMMENFASSUNG

1. Das Problem der Morphinbestimmung im Opium wurde hinsichtlich der vier Arbeitsphasen: Extraktion des Morphins aus dem Opium, Abtrennung der Hauptmenge an Begleitstoffen, Isolierung und quantitative Bestimmung des Morphins allgemein dargestellt.

2. In Versuchen mit reinen Alkaloiden sowie mit Opiummustern verschiedener Provenienz wurden die bisherigen Methoden zur Bestimmung des Morphins im Opium unter besonderer Zuhilfenahme chromatographischer Methoden überprüft. Die Fehlerquellen der einzelnen Methoden wurden aufgezeigt und die nach ihnen ermittelten Morphinwerte einander gegenübergestellt. Die officinellen und ein Teil der nicht officinellen Methoden vermitteln nicht den absoluten Morphingehalt des Opiums und können daher lediglich als Konventions-Methoden betrachtet werden.

3. Die Methode von Fischer und Folberth (36) wurde in modifizierter Form als Morphinbestimmungs-Methode für die Ph.Helv.VI in Vorschlag gebracht. Das Prinzip der neuen Methode besteht in der gravimetrischen oder titrimetrischen Bestimmung des durch Umsetzung mit Fluor-dinitrobenzol aus dem chromatographisch gereinigten Opiumauszug gefällten Morphin-dinitrophenyläthers.

4. Die Möglichkeiten zur Trennung und Bestimmung der wichtigsten Opiumalkaloide wurden aufgezeigt und die bisherigen Methoden zur Bestimmung dieser Alkaloide im Opium zusammengestellt und z.T. überprüft.

5. Eine neue Methode zur Bestimmung der Nebenalkaloide Kodein, Thebain, Papaverin und Narkotin im Opium wurde ausgearbeitet. Das Opium wird mit Salzsäure extrahiert, die Nebenalkaloide aus dem Säureauszug durch Extraktion mit Aether isoliert, durch Säulenverteilungschromatographie getrennt und als Reineckate gravimetrisch oder titrimetrisch bestimmt.

1. Achor L.B. und E.M.K. Geiling, *Anal.Chem.* 26, 1061 (1954)
2. Aklin O., *Diss. Strassbourg* (1957)
3. Anneler E., *Arch. Pharm.* 258, 130 (1920)
4. Anneler E., *Festschrift E.Ch.Barell* (1936)
5. van Arkel C.G., *Pharm. Wbl.* 72, 366 (1935)
6. Asahina H. und M.Ono, *UNO-Bericht ST/SOA/SER.K/40* (1955)
7. Asahina H. und M.Ono, *UNO-Bericht ST/SOA/SER.K/46* (1957)
8. Asahina H. und M.Ono, *UNO-Bericht ST/SOA/SER.K/50* (1957)
9. Asahina H. und Y.Shiuchi, *UNO-Bericht ST/SOA/SER.K/32* (1954)
10. Awe W. und J.Reinecke, *Arzneimittel Forsch.* 1, 417 (1951)
11. Baggesgaard-Rasmussen H., C.Hahn und K.Ilver, *Dansk T.Farm.* 19, 41 (1945)
12. Baggesgaard-Rasmussen H., K.A.Jackerott und J.C.Jespersen, *Pharm.Acta Helv.* 11, 307 (1936)
13. Baggesgaard-Rasmussen H. und J.C.Jespersen, *Dansk T.Farm.* 11, 278 (1937)
14. Baggesgaard-Rasmussen H. und F.Reimers, *Arch. Pharm.* 273, 129 (1935)
15. Bakre V.J., Z.Karaata, J.C.Bartlet und C.G.Farmilo, *UNO-Bericht ST/SOA/SER.K/79* (1958)
16. Balak F. und A.Jindra, *Cas.ces.lécarn.* 63, 125 (1950), *ref. Chem.Zbl.* 1956, 8163
17. Baumgarten G., *Arch.Pharm.* 271, 216 (1933)
18. Bettschart A., *Diss. No. 2408 ETH Zürich* (1954)
19. Böhme H. und Lampe, *Arch. Pharm.* 285, 422 (1952)
20. Böhme H. und R.Strohecker, *Arzneim. Forsch.* 3, 236 (1953)
21. Böhme H. und R.Strohecker, *Arzneim. Forsch.* 3, 468 (1953)
22. Brochmann-Hanssen E., *Medd.norsk.farm.Selsk.* 17, 76 (1955)
23. Brunner H., *Diss. ETH Zürich* (1938)
24. Büchi J. und H.Schumacher, *Pharm.Acta Helv.* 32, 273 (1957)
25. Burma D.P., *Naturwissenschaften* 41, 19 (1954)
26. Cramer J.N.S. und J.G.Voermann, *Dtsch.Apoth.Ztg.* 89, 956 (1949)
27. Dann O. und F.Wippert, *Dtsch.Apoth.Ztg.* 91, 905 (1951)
28. Dietzel R. und W.Huss, *Arch.Pharm.* 266, 641 (1928)
29. Dowzard E., T.K.Thomas und M.Russo, *J.amer.pharm.Ass. (sci.Ed.)* 26, 615 (1937)
30. Dyer M.S. und McBay, *J.amer.pharm.Ass. (sci.Ed.)* 44, 156 (1955)
31. Eder R., *Tschirch-Festschrift* 1926, 392
32. Eder R. und E.Wäckerlin, *J.Pharm.Pharmacol.* 10, 680 (1937)
33. Eder R. und E.Wäckerlin, *Pharm.Acta Helv.* 15, 227 (1940)
34. Farmilo C.G., W.P.McKinley, J.C.Bartlet, P.Oestreicher und A.Almond, *UNO-Bericht ST/SOA/SER.K/61* (1957)
35. Fischer A., *Dtsch.Apoth.Ztg.* 97, 23 (1957)
36. Fischer R. und K.Folberth, *Arzneim.Forsch.* 5, 66 (1955)
37. Garratt D.C., C.A.Johnson und C.L.Lloyd, *J.Pharm.Pharmacol.* 7, 914 (1957)
38. Georges L. und A.Gascard, *J.Pharm.Chim.* 25, 513 (1916)
39. Goin F.A., *An.Farmac.Biochim.* 5, 93 (1934)
40. Goldbaum L.R. und L.Kazyak, *J.Pharmacol.expr.Therap.* 106, 388 (1952)

41. Graf E., Dtsch.Apoth.Ztg. 91, 797 (1951)
42. Graf E. und H.P.List, Arzneim.Forsch. 4, 450 (1954)
43. Gränicher O.F., Diss. ETH Zürich (1936)
44. Grant E.W. und W.W.Hilty, J.amer.pharm.Ass. (sci.Ed.) 42, 150 (1953)
45. Grosfeld-Nir I., S.Gassner und E.Weissenberg, Bull.on narcotics, Vol. VI, No.2, 23 (1954)
46. Guillermond, J.Pharm.Chim. 14, 436 (1828)
47. Hamlow E.E., G.DeKay und E.Ramstad, J.amer.pharm.Ass. (sci.Ed.) 43, 460 (1954)
48. Heiduschka A. und M.Faul, Arch.Pharm. 255, 172 (1917)
49. Heumann W.R., Bull.on narcotics Vol. IX, No.2, 35 (1957)
50. Holubek J., Pharm.Zhalle 95, 435 (1956)
51. Holubek J., S.Kudrnac und M.Novak, Pharmazie 13, 95 (1958)
52. Jermstad A., Diss. Basel (1920)
53. Jermstad A. und J.Lothe, UNO-Bericht ST/SOA/SER.K/24 (1954)
54. Jindra A., Bull.on narcotics Vol. VII, No.2, 20 (1955)
55. Kamp W., Diss. Amsterdam (1956)
56. Klee F.C. und E.R.Kirch, J.amer.pharm.Ass. (sci.Ed.) 42, 146 (1953)
57. Kljatschkina B.und E.Stuber, Arch.Pharm. 271, 217 (1933)
58. Knaffl-Lenz E., PharmMh. 18, 17 (1937)
59. Knaffl-Lenz E., UNO-Bericht ST/SOA/SER.K/3 (1951)
60. Koch H. und E.Hannig, Pharm.Ztg. 88, 70 (1952)
61. Kofler L. und A.Kofler, Thermo-Mikromethoden, Wagner Verl. (1954)
62. Kolthoff I.M., Biochem.Z. 162, 289 (1925)
63. Küssner W., Mercks Jber. 54, 29 (1941)
64. Lautenschläger L., Arch.Pharm. 257, 13 (1919)
65. Lee Kum-Tatt und C.G.Farmilo, UNO-Bericht ST/SOA/SER.K/49 (1957)
66. Lee Kum-Tatt und C.G.Farmilo, J.Pharm.Pharmacol. 10, 427 (1958)
67. Levi L., P.Oestreicher und C.G.Farmilo, Bull.on narcotics Vol. I, 1 (1953)
68. Liang C.K., UNO-Bericht ST/SOA/SER.K/26 (1954)
69. Lindblad C.G. und A.Ågren, Farm.Rev. 53, 69 (1954)
70. Mannich C., Arch.Pharm. 273, 97 (1935)
71. Mannich C., Arch.Pharm. 280, 386 (1942)
72. Mariani A. und C.Vicari, J.Pharm.Belg. 38, 233 (1956)
73. Mariani A., S.Guarino und O.Marelli, Rend.Ist.super.Sanita 14, 733 (1951)
74. Marini-Bettolo G.B., Farmaco (Ed.prat.) 12, 110 (1957)
75. Miram S. und S.Pfeifer, Scientia pharm. 26, 153 (1958)
76. Nicholls J.R. und E.G.Kellet, UNO-Bericht ST/SOA/SER.K/6 (1951)
77. Nobili G., Boll.chim.farm. 79, 218 (1940)
78. Oberst F.W., J.Labor.a.clin.Med. 24, 318 (1938)
79. Parthasarathy C. und N.Rajagopalan, UNO-Bericht ST/SOA/SER.K/20 (1953)
80. Pfeifer S., Bull.on narcotics Vol. X, No.3, 18 (1958)
81. Pfeifer S., Pharmazie 13, 100 (1958)
82. Pfeifer S. und W.Keller, Pharm.Zhalle 95, 435 (1956)
83. Pinxteren J.A.C. und M.A.G.Smeets, Pharm.Wbl. 85, 55 (1950)
84. Prescott A.B., Amer.J.Pharm. 48, 59 (1876)
85. Pride R.A. und E.S.Stern, J.Pharm.Pharmacol. 6, 590 (1954)
86. Reimers F., Arch.Pharm. 269, 506 (1931)
87. Rusting N., Arch.Pharm. 269, 609 (1931)

88. Schumacher H., Diss.No.2690 ETH Zürich (1958)
89. Schultz O.E. und H.Goerner, Dtsch.Apoth.Ztg. 93, 585 (1953)
90. Schultz O.E., Arch.Pharm. 288, 520 (1955)
91. Schultz O.E. und G.Mayer, Dtsch.Apoth.Ztg. 92, 358 (1952)
92. Sekretariat der Vereinten Nationen, ST/SOA/SER.K/1 (1951)
93. Sekretariat der Vereinten Nationen, ST/SOA/SER.K/17 (1953)
94. Sekretariat der Vereinten Nationen, ST/SOA/SER.K/34 (1954)
95. Sekretariat der Vereinten Nationen, ST/SOA/SER.K/35 (1955)
96. Sekretariat der Vereinten Nationen, ST/SOA/SER.K/44 (1956)
97. Small L.F., Chemistry of the Opium Alkaloids, Washington 1932
98. Squibb, Arch. Pharm. 223, 291 (1885)
99. Svendsen A.B., Pharm.Acta Helv. 26, 323 (1951)
100. Svendsen A.B., E.D.Aarnes und A.Paulsen, Medd.norsk farm.Selsk. 17, 116 (1955)
101. Svendsen A.B. und E.D.Aarnes, Scientia pharm. 23, 18 (1955)
102. Svendsen A.B. und K.Bergane, Bull.on narcotics Vol. X, No.4, 17 (1958)
103. Tejgeler C.A., Pharm.Wbl. 94, 201 (1959)
104. Vollmer K., Dtsch.Apoth.Ztg. 95, 258 (1955)
105. Wagner G., Pharmazie 10, 470 (1955)
106. Wegner E., Pharmazie 5, 445 (1950)
107. Witte A.H., UNO-Bericht ST/SOA/SER.K/67 (1958)
108. Wydler E., Diss. ETH Zürich (1946)

LEBENS LAUF

Huber Richard, Sohn des Heinrich Huber und der Margareth, geb. Kurzböck, wurde am 19. Januar 1929 in Brixen/Italien geboren. Dasselbst besuchte er die italienische Elementarschule und hierauf in Feldkirch/Oesterreich das Gymnasium, wo er im Jahre 1949 die Reifeprüfung bestand. Im Herbst des gleichen Jahres begann er an der Leopold-Franzens-Universität in Innsbruck das Pharmaziestudium und erhielt im Herbst 1953 das Diplom als Magister der Pharmazie. Die vorgeschriebene zweijährige Apothekenpraxis absolvierte er in der Stadt-Apotheke in Feldkirch und arbeitete sodann in verschiedenen Apotheken in der Schweiz.

Die vorliegende Promotionsarbeit führte er in der Zeit vom Herbst 1957 bis zum Frühjahr 1959 unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. J. Büchi am Pharmazeutischen Institut der Eidgenössischen Technischen Hochschule in Zürich aus.