

#### IV. Hauptthema: Chemische Toxikologie

##### H. BRANDENBERGER (Zürich): Methodische Entwicklung in der chemischen Toxikologie.

Im Jahre 1878 wurde in Tübingen der Tod einer 82jährigen Frau als Giftmord mittels Morphin diagnostiziert. Der Experte stützte sich dabei einzig und allein auf einen positiven Jodsäure-Test. Aber wir brauchen gar nicht so weit zurückzugreifen. Es sind noch nicht allzu viele Jahre vergangen, seitdem man über An- oder Abwesenheit von Morphin in einem Extrakt lediglich mit Hilfe der beiden Reaktionen von MARQUIS und FRÖHDE entschied. Diese Farbteste sprechen nun aber, wie bekannt, nicht nur auf Alkaloide an, sondern auch auf einfache phenolische Verbindungen, also auf Stoffe, die im verwesenden Organismus produziert werden.

Es handelt sich hier nicht darum, den Wert von Farbreaktionen in Frage zu stellen, denen, im Rahmen eines vielseitigen analytischen

Tabelle 1

- 
1. *Chromatographie*
    - a) Dünnschicht-Chromatographie
    - b) Gas-Chromatographie
  2. *Molekulare Spektrophotometrie*
    - a) Absorption im ultravioletten und im sichtbaren Bereich
    - b) Infrarot-Absorption
  3. *Atomare Spektrophotometrie*
    - a) Flammen-Emissionsanalyse
    - b) Atomare Absorptionsanalyse
  4. *Isotopen-Verfahren*
    - a) Radio-Verdünnungsmethoden
    - b) Isotopentitration
    - c) Neutronen-Aktivierungsanalyse
  5. *Enzymatische Analyse*

Gerüstes und in Kenntnis ihrer Unvollkommenheit verwendet, auch heute noch ihre Funktion zukommen kann. Wir möchten lediglich hervorheben, wie viel leichter wir es heute haben als unsere Kollegen vor 100, vor 20, ja vor kurzen 10 Jahren. Besitzen wir doch sowohl für Identifikation als auch für quantitative Bestimmung eine solche Fülle von selektiven, hochempfindlichen und, da oft selbstregistrierend, für die Forensik mit ihrem Bedürfnis nach Dokumentation wie nach Maß geschnittenen Methoden, daß oft die Qual der Wahl zu einer Hauptsorge

des Analysators werden kann. Eine Beschränkung in der Wahl der Methodik ist den meisten von uns allerdings auferlegt, nämlich diejenige durch die Höhe der vorhandenen Kredite, verlangen doch die modernen instrumental-analytischen Verfahren oft ganz beträchtliche Mittel.

In unserem Zürcher Institut hatten wir vor drei Jahren die erwähnte Qual der Wahl, als es galt, unsere chemisch-toxikologische Untersuchungsstelle zu modernisieren und vollständig neu zu instrumentieren. Im folgenden Bericht (der auch als Einführung für die Besichtigung unserer Laboratorien am Schlusse dieser Tagung dient) versuchen wir zu schildern, wie wir gewählt haben und warum.

Hauptstützen unserer analytischen Tätigkeit (Tabelle 1) sind die Verfahren der Chromatographie, wobei insbesondere die Dünnschicht-Chromatographie und die Gas-Chromatographie zum Zuge kommen, sowie der Spektrophotometrie, wobei im organischen Sektor natürlich die Molekular-Spektrophotometrie, im anorganischen Sektor die atomare Spektrophotometrie im Vordergrund steht. Mehr im Entwicklungsstadium und noch nicht voll eingesetzt sind bei uns die Methoden, die mit Hilfe radioaktiver Isotopen arbeiten, sowie auch die enzymatischen Analysenverfahren.

#### *Beispiele für den Einsatz der Gaschromatographie*

So wie die Dünnschichtchromatographie durch Ausnützung der möglichen Variablen wie Schichtmaterial, Lösungsmittel-Systeme und Revelation der Substanz-Flecken durch Licht verschiedener Wellenlänge vor und nach Anfärbung zu einem anpassungsfähigen analytischen Instrument geworden ist, ergeben sich heute auch bei der gaschromatographischen Analyse bei einem flexiblen Einsatz unerhörte Möglichkeiten. Wir denken hier weniger an die Auswahl von Trennkolonne und Arbeitstemperatur als an die Wahl des Detektors respektive der Detektorsysteme.

Wir arbeiten neuerdings sehr oft mit dem sogenannten „Dual Channel“ System, in welchem das Eluat aus einer Kolonne zwei verschiedenartige parallel geschaltene Detektoren speist<sup>1</sup>.

Der Flammenionisationsdetektor spricht auf alle brennbaren organischen Verbindungen an, welche die Kolonne verlassen, wobei die Höhe seines Signals von der Kohlenstoffzahl der Moleküle und ihrer Konzentration abhängt. Er figuriert demnach in gewissem Sinne als Massenmonitor.

Der Elektroneneinfangdetektor hingegen ist ein sehr spezifisches Instrument, das auf Verbindungen mit hoher Elektronenaffinität äußerst stark anspricht, andere Verbindungen hingegen, die nicht zu einer Anlagerung von Elektronen neigen, praktisch vollständig ignoriert. Zu den Verbindungen mit hoher Elektronenaffinität gehören nun sehr

viele toxikologisch wichtige Substanzen, wie z. B. Chlorkohlenwasserstoffe, chlorhaltige Pestizide, Verbindungen die Phosphor und Schwefel oder beide Elemente enthalten (Thiophosphorsäureester), bromhaltige Schlaf- und Beruhigungsmittel, Nitroverbindungen,  $\alpha$ -Dicarbonyl-Verbindungen. Alle diese Substanzen regen den Elektroneneinfangdetektor zu überaus starken Signalen an, während die Ausschläge im Flammenionisationsdetektor sich im Rahmen des Normalen bewegen.

Diese Kombination von Detektoren erlaubt uns demnach, von einer aus der Kolonne tretenden Substanz sofort zu sagen, ob sie in eine uns interessierende Substanzgruppe gehört oder nicht.

Tabelle 2

Substanz	Bedingungen	Empfindlichkeit in g	
		FID	EED
Hexan	5' $\times$ 1/8'' 10% Dow 11 auf Chromosorb W HMDS 195° C	10 <sup>-10</sup>	10 <sup>-6</sup>
Lindan		10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-12</sup>
Aldrin		10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-11</sup>
Dieldrin		10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-10</sup>
DDT		10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-10</sup>
Parathion		10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-11</sup>
Voluntal	5' $\times$ 1/8'' 10% Carbowax 20 M auf Chromosorb W HMDS, 150° C	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-11</sup>
Abasin		10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-9</sup>
Bromural		10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-9</sup>
Valamin		10 <sup>-7</sup>	—

Tabelle 2 zeigt die Ansprechempfindlichkeit der beiden Detektoren für einige Pestizide und Schlafmittel<sup>2</sup>. Arbeitet man z. B. mit dem Lösungsmittel Hexan, so wird dieses bei der Erfassung mit dem Elektroneneinfang-Detektor gegenüber halogenhaltigen Verbindungen in den Hintergrund treten. Der Ausschlag dieses Detektors hängt stark ab vom Halogen-Gehalt der zu erfassenden Verbindung, deren Elektronen-Affinität mit steigendem Halogen-Gehalt wächst. Besonders hohe Signale verursacht bei den Pestiziden das Lindan mit seinen 73% Chlor im Molekül, bei den halogen-haltigen Schlafmitteln das Voluntal mit seinen 3 Chloratomen. Umgekehrt tritt das halogen-freie Valamin im Elektroneneinfang-Detektor gar nicht in Erscheinung.

Abb. 1 zeigt das Gaschromatogramm einer Lösung von 1 ppm Voluntal und je 100 ppm Abasin und Bromural. Trotzdem 100 mal weniger Voluntal verwendet wurde, zeigt der Elektroneneinfang-Detektor ein beträchtliches Signal. Der größere Ausschlag für Bromural gegenüber Abasin resultiert aus dessen kleinerem Molekulargewicht respektive größerem Bromgehalt. Der Flammenionisations-Detektor vermag in den

vorhandenen kleinen Konzentrationen keines der 3 Schlafmittel zu registrieren, lediglich das Lösungsmittel Hexan. Für das Gaschromatogramm in Abb. 2 wurde das Voluntal durch Valamin ersetzt und zwar in der bedeutend höheren Konzentration von 1000 ppm. Diese Verbindung wird nur mit dem Flammen-Detektor registriert.

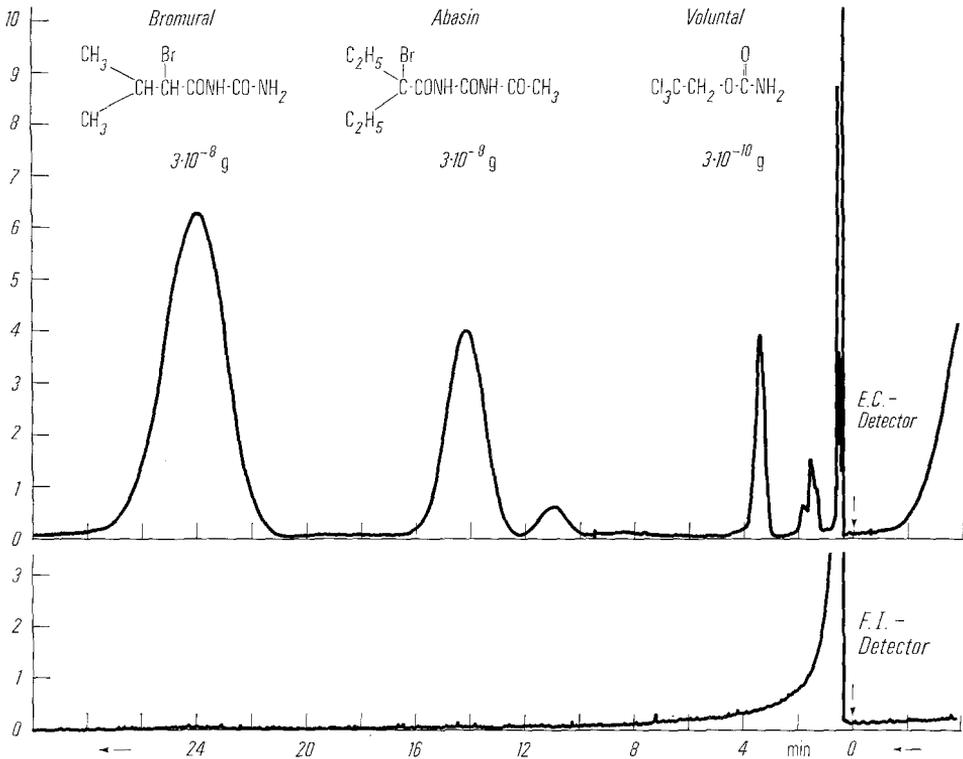


Abb. 1. GC: Aerograph 204. Kolonne:  $5' \times \frac{1}{8}''$ , 10% Carbowax 20 M. Chrom .W-HMDS-60/80 mesh. Temp.:  $150^\circ \text{N}_2$ : 40/min ml. Verstärker:  $1 \times 4$ . Probe:  $1 \mu\text{l}$  Lösung in Äther. Splitter: 1:1

Natürlich kann man eine gaschromatische Analyse auch ohne „Dual Channel“ System spezifisch gestalten. So erfassen wir z. B. beim Nachweis von Chloralhydrat in den Wasserdampfdestillaten biologischer Materialien je nach Wahl des pH-Wertes bei der Vorextraktion das freie Chloral, sein Zersetzungsprodukt Chloroform oder auch beide Substanzen gemeinsam auf der gleichen Kolonne<sup>3</sup>. Doch bietet auch hier die Verwendung zweier parallel geschalteter Detektoren zusätzliche Sicherheit.

Als Beispiel für die Erfassung von Pestiziden wollen wir ein gaschromatographisches Nachweisverfahren für Parathion<sup>2</sup> in Körperflüssigkeiten und Organen erwähnen, welches wir kürzlich ausgearbeitet

haben und seither mit Erfolg zur Aufklärung von Vergiftungsfällen heranziehen: Das biologische Material wird getrocknet und fein pulverisiert, dann kalt mit Hexan oder Benzol extrahiert, was gut in einer kleinen Glaskolonne im Durchlauf geschehen kann. Der organische Extrakt läßt sich ohne Verluste an Parathion auf kleines Volumen eindampfen;

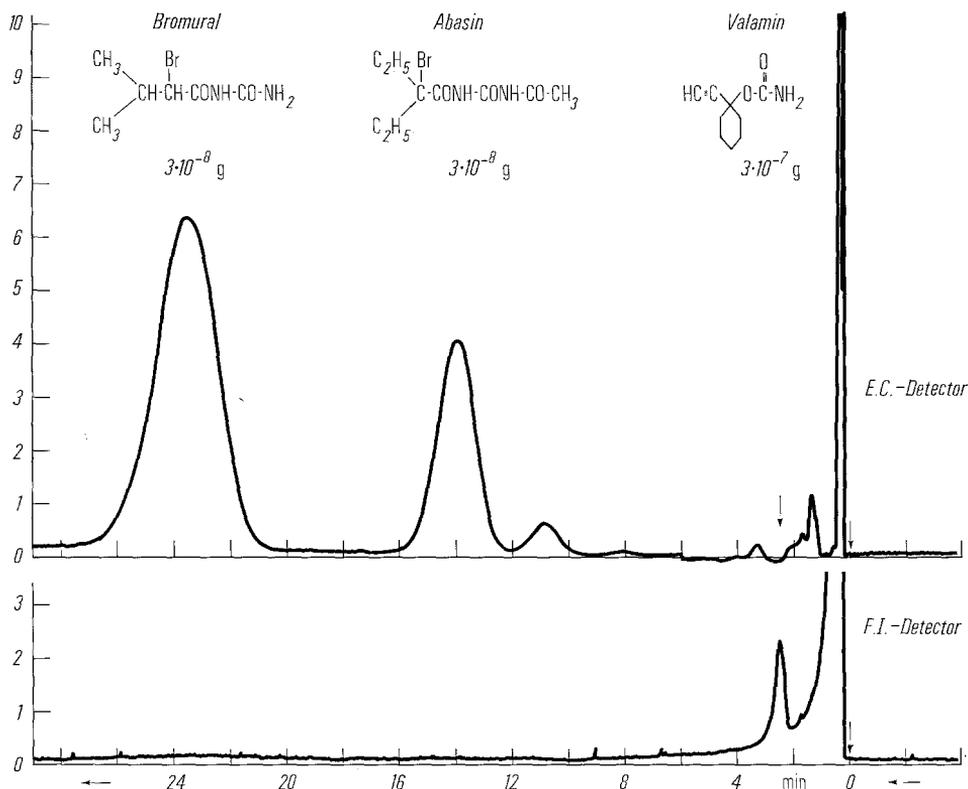


Abb. 2. GC: Aerograph 204. Kolonne:  $5' \times 1/8''$ , 10% Carbowax 20 M. Chrom. W-HMDS-60/80 mesh. Temp.:  $150^\circ$  N<sub>2</sub>: 40 ml/min. Verstärker:  $1 \times 4$ . Probe: 1  $\mu$ l Lösung in Äther. Splitter: 1:1

das Konzentrat wird in der „Dual Channel“ Anordnung chromatographiert. Abb. 3 zeigt eine solche Analyse mit der dazugehörigen Kalibrationsreihe, die bei quantitativen Bestimmungen mit dem Elektroneneinfang-Detektor immer mitzuführen ist. Wir hätten in diesem Beispiel das Signal noch 4 mal verstärken können; es wären also noch ca. 50 mal geringere Parathion-Mengen erfaßbar gewesen.

#### Beispiel für den Einsatz der Infrarot-Spektrophotometrie

Wie die Gaschromatographie, so nimmt auch die Infrarot-Spektrophotometrie eine ständig wachsende Funktion ein in unserem analytischen

Service. Wir können an dieser Stelle lediglich ein Beispiel anführen und wollen die Identifikation der Barbiturate wählen<sup>4</sup>.

Nach Extraktion der Pharmaka aus dem biologischen Material mittels Chloroform oder Äther unterteilen wir die Inhaltsstoffe der organi-

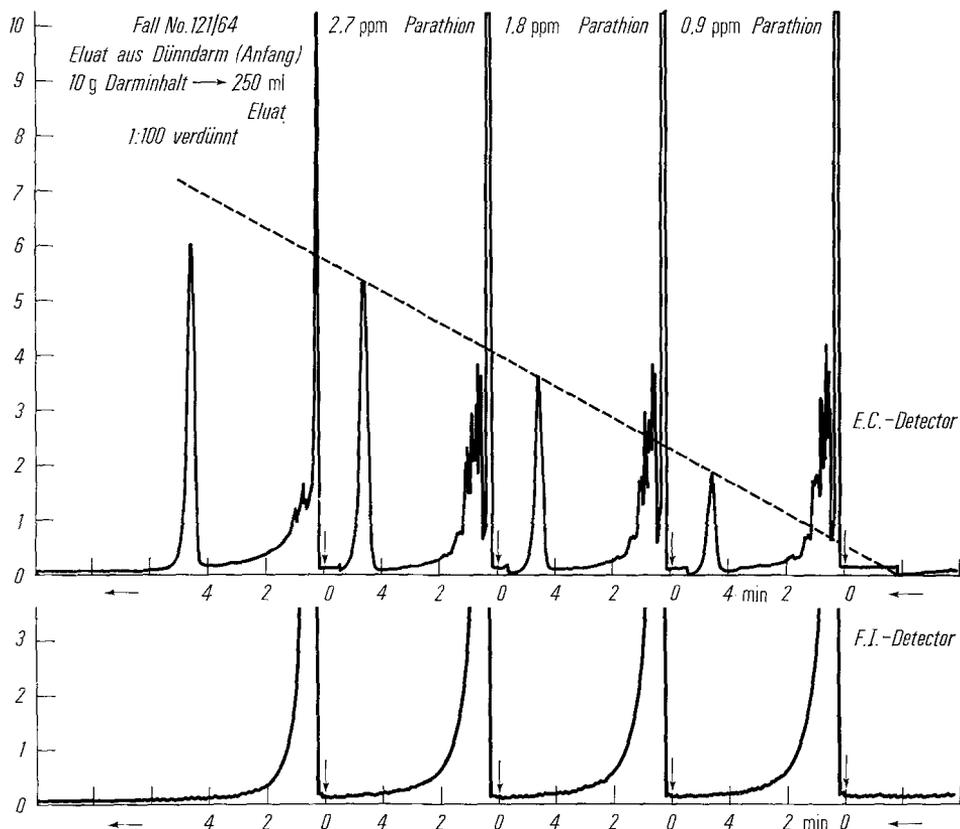


Abb. 3. GC: Aerograph 204. Kolonne:  $5' \times \frac{1}{8}''$ , 10% Dow 11-Chrom. W-HMDS-60/80 mesh. Temp.:  $195^\circ \text{N}_2$ : 45 ml/min. Verstärker:  $1 \times 4$ . Probe: 1  $\mu\text{l}$  Lösung in Petroläther. Splitter: 1:1

schen Extrakte meist durch flüssig-flüssig Extraktion in starke Säuren, schwache Säuren und Neutralstoffe. Die Barbiturate finden sich dabei in der Fraktion der schwachen Säuren, welche fast immer in zufriedenstellender Reinheit anfällt, da neutrale Verunreinigungen wie Fette sich in der Neutralfraktion anreichern, saure Verunreinigungen meist bei den starken Säuren zu finden sind. Der Barbiturat-Gruppenachweis erfolgt selbstverständlich UV-spektrophotometrisch. Die UV-Spektren geben auch darüber Auskunft, ob ein normales 5,5-disubstituiertes Barbiturat, ein N-Methyl-barbiturat oder gar ein Thiobarbiturat

vorliegt. Beträchtlich über diese Gruppeneinteilung hinaus gehen wir jedoch auf Grund der UV-Spektren nicht. Die strenge Identifikation erfolgte IR-spektrophotometrisch, meist nach Reinigung des schwach sauren Extraktes durch fraktionierte Vakuum-Sublimation.

Auch beim Vorliegen von sehr kleinen Barbituratmengen ist unser Vorgehen sehr einfach. Anstelle einer gewöhnlichen Kaliumbromid-

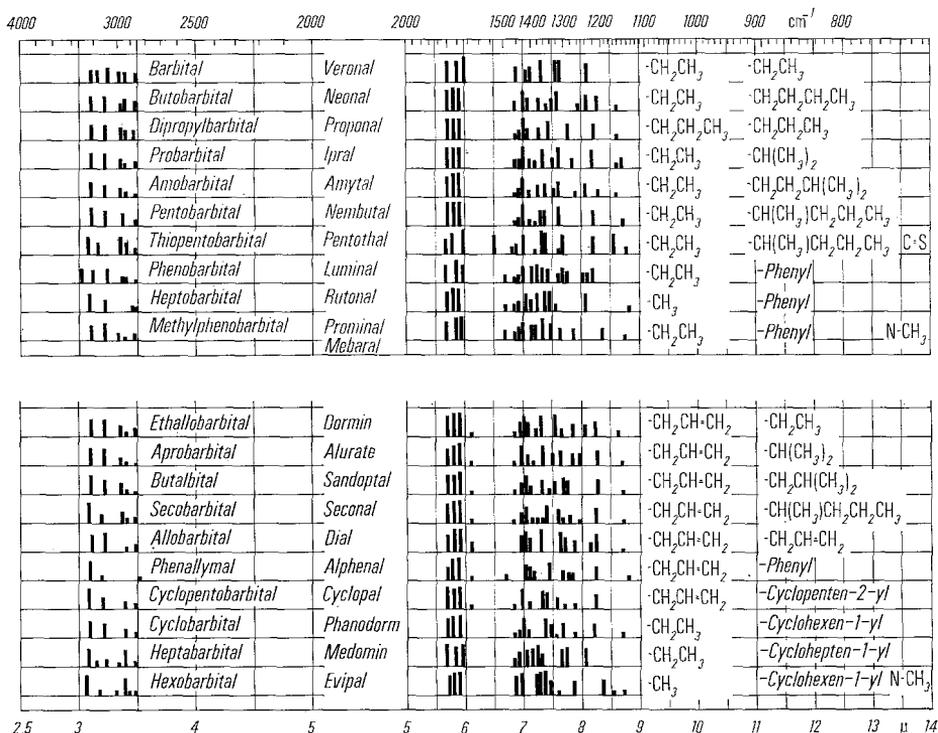


Abb. 4. IR-Banden von 20 Barbituraten von 3—3,5 und 5—9  $\mu$ .

Pille mit 13 mm Durchmesser setzen wir in den Pillenhalter einen Bleiring ein. Dessen Loch von 2 bis 3 mm Durchmesser enthält das Gemisch Kaliumbromid plus Barbiturat (Sublimat des schwach sauren Extraktes). Bleiring mit Füllung sind wie eine gewöhnliche Pille gepreßt worden. Schon mit 10 Gamma Barbiturat läßt sich auf diese Weise auch ohne Strahlengang-Kondensator ein einwandfreies Spektrum aufnehmen.

Abb. 4 zeigt eine Zusammenstellung der IR-Banden von 20 Barbituraten. Auf Grund von Lage und Intensität der Banden können wir nicht nur eine Gruppeneinteilung vornehmen, die weitergeht als diejenige auf Grund der UV-Spektren, sondern auch jede Einzelidentifikation durchführen. Zuerst zur Gruppeneinteilung:

1. Thiobarbiturate zeichnen sich aus durch die starke N—C=S-Bande bei  $6,5 \mu$  und die Bande bei  $8,55 \mu$ , die in den anderen Barbituraten abwesend sind.

2. N-Methylbarbiturate besitzen, im Unterschied zu den nur disubstituierten Verbindungen, eine mittlere bis starke Absorptionsbande zwischen  $8,35$  und  $8,4 \mu$ .

3. Ein Allylsubstituent in 5-Stellung macht sich durch eine schwache Bande bei  $6,1 \mu$  bemerkbar. Sollte hier auf Grund der KBr-Spektren Ungewißheit herrschen, so wird eine Aufnahme in Nujol Gewißheit geben. Im Dial mit seinen 2 Allylresten ist die Bande bei  $6,1 \mu$  von mittlerer Stärke.

4. Phenylsubstituenten in 5-Stellung sind verantwortlich für das Auftreten einer mittleren Bande bei  $6,7 \mu$ .

Alle diese Daten lassen sich aus einem Barbiturat-Spektrum leicht auch ohne Verwendung von Vergleichsmaterial herauslesen. Für Einzelidentifikationen bedient man sich aber am besten einer Vergleichskartei. Im Spektralabschnitt zwischen  $7$  und  $8,5 \mu$  ist jedes Barbiturat von allen anderen genügend verschieden, um diese Einzelidentifikationen mit absoluter Sicherheit zu gestatten. Für einige Verbindungen wie Barbitol oder Phenobarbitol genügt auch das kleine Spektralgebiet zwischen  $3$  und  $3,5 \mu$  zur sicheren Identifizierung.

#### *Beispiele für den Einsatz der atomaren Absorptions-Spektrophotometrie*

Bei der Bestimmung der Metalle wird in unserem Laboratorium die Flammen-Emissions-Analyse seit über einem Jahre durch die atomare Absorptions-Analyse ergänzt, zum Teil ersetzt. Prinzipiell ist die eine Methode die Umkehrung der anderen. In der Flammen-Emissions-Spektrophotometrie wird die Probelösung in einer Flamme versprüht, und die Lage und Intensität der dabei durch thermische Anregung der Elemente erzeugten Emissionslinien spektralphotometrisch ausgemessen. In der atomaren Absorptions-Analyse dient die Flamme nicht der Anregung, sondern lediglich zum Freisetzen und Atomisieren der zu bestimmenden Atome, wozu grundsätzlich auch andere Hilfsmittel benützt werden könnten. Ich verwende deshalb auch nicht den im deutschen Sprachgebrauch üblichen Ausdruck Flammen-Absorptions-Analyse, sondern die allgemeinere Bezeichnung atomare Absorptions-Analyse.

Abb. 5 schematisiert den Aufbau eines Spektralphotometers für atomare Absorption. Ein solches besteht grundsätzlich aus Lampe, welche die Spektrallinien des zu bestimmenden Elementes aussendet (Hohlkathodenlampen oder Niederdruck-Entladungslampen), Sprühvorrichtung (meist Flamme) zur atomaren Verteilung des zu bestimmenden Elementes im Strahlengang der Lampe, Monochromator mit Spalt-system zur scharfen Aussonderung der auszuwertenden Spektrallinie,

sowie Detektor, Verstärker und Anzeige-Instrument (z. B. Potentiometerschreiber) zur Registrierung der durch das eingesprühte Element bewirkten Lichtschwächung.

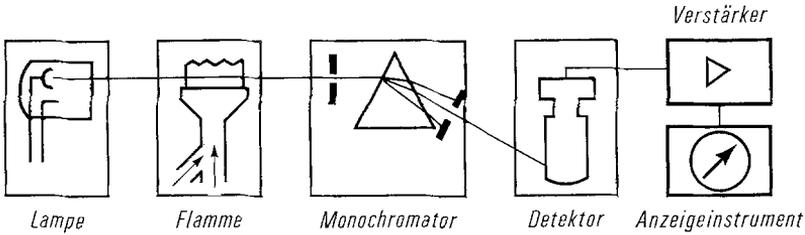


Abb. 5. Aufbau eines Spektralphotometers für atomare Absorption

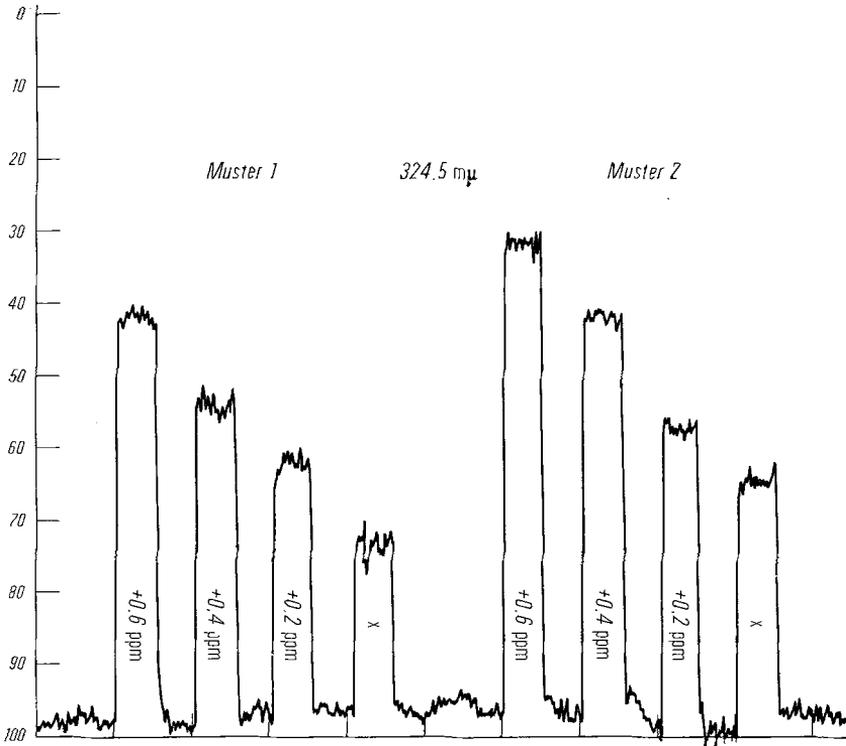


Abb. 6. Flammen-Absorption. Cu-Bestimmung in Urin, Additionsverfahren

Da sich auch in heißen Flammen nur ein sehr geringer Teil der Atome im angeregten Zustande befindet und Licht emittiert, der überwiegende Anteil hingegen im Grundzustand zur Lichtabsorption befähigt ist, bildet die atomare Absorptions-Analyse für die meisten Metalle ein bedeutend empfindlicheres Nachweisverfahren als die atomare Emission.

Besonderes Interesse weckt die atomare Absorptionsanalyse sowohl beim Toxikologen wie auch beim Kliniker, weil sie gestattet, eine ganze Reihe von Metallen im Urin oder Serum direkt zu bestimmen, wobei der Aufschluß durch die versprühende Flamme, also ohne jeden Zeitverlust, erfolgt. Zu den uns interessierenden Metallen, die sich so bestimmen lassen, gehören Silber, Kupfer, Cadmium, Chrom, Nickel, Zink und Magnesium. Um den Einfluß von Viscositätsunterschieden in den biologischen Flüssigkeiten zu eliminieren, verwendet man mit Vorteil an Stelle einer Kalibrationskurve die Methode der Addition.

Abb. 6 illustriert diese Methodik anhand der Erfassung von Kupfer in 2 Urinproben. Nach der Bestimmung des Ausschlages bei der unbekanntem Konzentration werden bestimmte Mengen des nachzuweisenden Elementes zugesetzt. Durch Extrapolation der Extinktionswerte erhält man die zu bestimmende Konzentration.

#### *Ausblick*

Die vorstehenden Beispiele hatten den Zweck, Ihnen einen Eindruck von unserem „*approach*“ zur komplexen Aufgabe des Giftstoffnachweises im biologischen Material zu vermitteln. Die Zeit reichte nicht für einen Gesamtüberblick, wir konnten hier lediglich auf drei der verwendeten instrumental-analytischen Verfahren eintreten, nämlich die Gaschromatographie, die Infrarot-Spektrophotometrie und die atomare Absorptionsanalyse. Eine solche Auswahl ist immer willkürlich. Methoden wie die Ultraviolett-Spektrophotometrie und die Dünnschicht-Chromatographie werden selbstverständlich auch in unserem Laboratorium ihre Bedeutung behalten.

Inwieweit die Radioisotopen-Verfahren als Routineverfahren in ein toxikologisches Servicelaboratorium eingebaut werden können, wird sich noch zeigen müssen. Wir hoffen, daß sich vor allem die Isotopen-Titration zu einer einsatzkräftigen Bestimmungsmethode für Spuremetalle entwickeln wird, stellt sie doch weit geringere instrumentelle und räumliche Anforderungen als die Neutronenaktivierungs-Analyse.

Wir sind uns auch voll bewußt, daß wir bei unserem jetzigen Ausbau nicht halt machen können. Es gilt, möglichst bald die Voraussetzungen für einen Einsatz der Spektrofluorometrie zu schaffen. Wir glauben ferner, daß auch das Verfahren der Massenspektroskopie eine willkommene Stärkung unseres analytisch-toxikologischen Dienstes bedeuten würde. Eine so verantwortungsvolle und komplexe Aufgabe, wie es die Erfassung von Giftstoffen in menschlichen Organen und Körperflüssigkeiten darstellt, verlangt, daß man methodisch möglichst vielseitig ist und die Entwicklungen und Bestrebungen der analytischen Chemie verfolgt und übernimmt, sobald sich dazu immer die Möglichkeit bietet.

*Zusammenfassung*

Es wird über den Ausbau des toxikologisch-chemischen Laboratoriums am Gerichtlich-medizinischen Institut der Universität Zürich berichtet. Der Einsatz moderner instrumental-analytischer Verfahren ist anhand von Beispielen aus der Gaschromatographie (Bestimmung von Schlafmitteln und Pestiziden mit der „Dual Channel“ Anordnung), der Infrarot-Spektrophotometrie (Identifikation von Barbituraten) und der atomaren Absorptions-Analyse (Erfassung von Spuren-Metallen) illustriert.

*Summary*

A report is made on the instrumentation in the Laboratory for Chemical Toxicology at the Institute of Legal Medicine of Zurich University. The application of modern analytical methods is illustrated by means of examples taken from gas chromatography (determination of soporifics and pesticides using a dual channel system), infrared spectrophotometry (identification of barbiturates) and atomic absorption analysis (determination of trace metals).

*Literatur*

<sup>1</sup> LOVELOCK, J. F.: *Analyt. Chem.* **35**, 474 (1963). — OAKS, D. M., H. HARTMANN, and K. P. DIMICK: *Analyt. Chem.* **36**, 1560 (1964).

<sup>2</sup> Unveröffentlichte Versuche mit S. MÜLLER.

<sup>3</sup> BRANDENBERGER, H.: *Chimia* **17**, 252 (1963).

<sup>4</sup> Wir danken der Firma F. Hoffmann-La Roche für die Unterstützung dieses Teiles der Arbeit.

DR. HANS BRANDENBERGER  
Gerichtlich-medizinisches Institut der Universität  
Zürich, Zürichbergstr. 8

**A. FUCHS (Zürich): Nachweis von Schwermetallen durch Isotopentitration.**

Angeregt durch eine Arbeit von E. SCHUMACHER<sup>1</sup> haben wir eine Mikromethode zur quantitativen Bestimmung von Nanogrammengen von Blei, Quecksilber und anderen Schwermetallen entwickelt, deren Vorteil in einer hohen Empfindlichkeit und Präzision liegt. Es handelt sich um eine komplexometrische Bestimmung mit Kobalt-60 als nicht-isotopem radioaktivem Indicator.

Das Prinzip ist folgendes: Wenn in einer Lösung mehrere Elemente vorliegen, die in der Lage sind, mit einem Komplexbildner zu reagieren, so werden bei einem Unterschuss des letzteren vorwiegend jene Elemente reagieren, die die beständigsten Komplexverbindungen eingehen. So bildet z. B. Äthylendiamintetraessigsäure (EDTA) mit Blei einen ca. 54mal stabileren Komplex als mit Kobalt. Bei der Zugabe von EDTA