

Z. Rechtsmedizin 76, 159 - 186 (1975)

© by Springer-Verlag 1975

Übersichtsreferat—Review Article

Einsatz der kombinierten Spektroskopie in der toxikologischen Analytik

J. BÄUMLER und H. BRANDENBERGER

Gerichtschemische Laboratorien Basel-Stadt und Chemische Abteilung
Gerichtsmedizinisches Institut der Universität Zürich (Schweiz)

Eingegangen am 27. Februar 1975

The Use of Combined Spectroscopy in Analytical Toxicology

Summary: The combined application of the four spectrometric techniques UV, IR, NMR and MS is an important analytical tool for the identification of the increasing number of potential poisons with which the analysts in the fields of forensic sciences and toxicology are confronted. Some of the contributions of these techniques to toxicological analyses are reviewed and illustrated by a few examples. Furthermore, the incorporation of the four methods into the analytical scheme, the requirements with respect to quantity and purity of the unknown substances, as well as the different possibilities for the combination of separation and identification techniques are outlined.

Zusammenfassung: Der forensisch-toxikologische Analytiker steht oft vor dem Problem der Strukturaufklärung einer ihm unbekanntem Verbindung, die den verschiedensten Stoffklassen angehören kann. Die kombinierte Anwendung der vier spektroskopischen Methoden UV, IR, NMR und MS ist dabei eine große Hilfe. Es wurde eine kurze Übersicht gegeben über für den chemischen Toxikologen besonders nützliche Aussagemöglichkeiten der einzelnen Verfahren. Ferner wird gezeigt, wie die vier Methoden im Rahmen von Giftstoffanalysen zum Einsatz kommen können. Die Schlagkraft ihrer kombinierten Anwendung wird an Beispielen aufgezeigt und erläutert.

Key words: IR-Spektrometrie - Toxikologie - kombinierte Spektroskopie - UV-Spektrometrie - Massenspektrometrie - Kernresonanzspektrometrie

In den Nachkriegsjahren haben die chromatographischen Nachweisverfahren die klassische Mikrochemie abgelöst. Zuerst faßte die Papierchromatographie Fuß, nach 1960 die Dünnschichtchromatographie und Gaschromatographie. Gleichzeitig wurden auch vermehrt instrumentelle Methoden zum Nachweis unbekannter Stoffe herangezogen. Bedeutung erlangten zuerst UV-Spektrometrie und IR-Spektrometrie, neuerdings auch Massenspektrometrie und Kernresonanzspektroskopie. Auf die Vorteile der kombinierten Analysetechnik wiesen zuerst SILVERSTEIN und BASSLER, später u.a. SIMON und CLERC hin. Heute wird dieses Prinzip in zahlreichen organisch-chemischen Laboratorien angewendet.

Die chemische, speziell die forensisch-chemische Toxikologie steht bei einer für den Untersucher unbekanntem Verbindung immer wieder vor der Aufgabe einer

Strukturaufklärung. Die Erfolge der kombinierten Anwendung der genannten vier instrumentellen Methoden ermunterten denn auch Toxikologen, sich mit dieser Art Analytik vertraut zu machen. Daher wird hier auf die Kombination spektroskopischer Methoden zur Lösung toxikologisch-chemischer Probleme eingegangen.

Der Toxikologe vermag sich meist nicht auf alle spektroskopischen Verfahren zu spezialisieren; er wird deshalb auch nicht alle Informationen der erhaltenen Spektren auswerten können. Bei der Interpretation muß er vielmehr versuchen, die wichtigen Banden oder Peaks zu erkennen, einzuordnen und die unbekannte Substanz durch Zusammenfügen der Teilergebnisse zu identifizieren.

I. IDENTIFIKATION DURCH DIE METHODEN DER INSTRUMENTELLEN ANALYTIK

Im folgenden wollen wir zuerst die Aussagemöglichkeiten der einzelnen spektroskopischen Methoden erläutern, dann an einigen Beispielen die Schlagkraft ihrer kombinierten Anwendung aufzeigen und schließlich die praktische Realisierbarkeit eines solchen Vorgehens im Rahmen unserer Isolierungs- und Fraktionierungsmöglichkeiten behandeln.

1. Elektronen-Spektroskopie

Die molekulare Absorption im ultravioletten und sichtbaren Spektralbereich (fortan UV genannt) ist abhängig von der elektronischen Struktur. Für praktische Belange ist die UV-Spektroskopie auf die Erfassung von über 200 nm absorbierenden konjugierten Systemen beschränkt. Diese können vielfach in Molekülen verschiedener Größen und Komplexität erkannt werden, nämlich immer dann, wenn der Rest des Moleküls im Meßbereich transparent ist. Im Gegensatz zu anderen spektralphotometrischen Verfahren steigt daher die UV-spektrometrische Komplexität mit der Molekülgröße nicht unbedingt an, was die Erkennung von Molekülteilen ganz gewaltig vereinfacht.

a. Im praktisch verwendbaren Spektralbereich lassen sich folgende Banden erkennen;

Konjugationsbanden (K-Banden) sind verursacht durch konjugierte C=C Strukturen wie Butadien (217 nm) und Hexatrien (258 nm) sowie durch konjugierte Systeme, an denen auch Heteroatome Anteil haben, wie z.B. Acrolein (210 nm). Sie sind meist intensiv ($\epsilon > 10^4$) und lassen sich deshalb leicht erkennen. Sie treten auch auf, wenn ein Chromophor zu einem aromatischen Kern in Konjugation steht wie im Styrol oder Benzaldehyd. Sind lediglich C=C Bindungen konjugiert, so ist die Lage der Maxima unabhängig von der Lösungsmittel-Polarität, Sind Heteroatome beteiligt (wie bei konjugiertem Carbonyl),

so bewirkt eine Erhöhung der Lösungsmittel-Polarität einen bathochromen Effekt.

Benzenoide Banden (B-Banden) sind verursacht durch aromatische und heteroaromatische Strukturen. Sie sind in der Regel breit (z.B. im Benzol von 230 bis 270 nm) und besitzen eine aufgelagerte Feinstruktur, die je nach Polarität des Lösungsmittels mehr oder weniger gegliedert sein kann. In mehrfach substituierten aromatischen Kernen ist die Feinstruktur meist nicht erkennbar. B-Banden sind von mittlerer Intensität (ϵ zwischen 100 und 2500).

Radikalartige Banden (R-Banden) sind verursacht durch isolierte Chromophore, z.B. Carbonylgruppen (290 nm für Acetaldehyd, 279 nm für Aceton) oder Nitrogruppen (271 nm für Nitromethan). Sie sind wenig intensiv ($\epsilon < 100$) und treten deshalb nur hervor, wenn die Verbindungen in höheren Konzentrationen vorliegen ($> 10^{-3}$ molar).

b. Wichtig für die Interpretation ist auch die Kenntnis der gegenseitigen Beeinflussung der Strukturelemente:

- Ist der aromatische Ring einer chromophoren Gruppe benachbart, so wird die B-Bande bathochrom verschoben. So zeigt Styrol z.B. eine K-Bande bei 244 nm ($\epsilon = 12'000$) und eine B-Bande bei 282 ($\epsilon = 450$), Acetophenon eine K-Bande bei 240 nm ($\epsilon = 13'000$), eine B-Bande bei 278 ($\epsilon = 1100$) und eine R-Bande bei 319 nm ($\epsilon = 50$).

- Auch R-Banden von aromatisch-konjugierten Gruppen können sich bathochrom verschieben. Sie kommen so in einen Spektralbereich zu liegen, in dem sie unter Umständen trotz ihrer geringen Intensität gut erkannt werden können (s.o. Acetophenon).

- Die durch isolierte C=C Doppelbindungen erzeugten intensiven Banden ($\epsilon > 2000$) (E_1 - und E_2 -Banden) liegen, wie erwähnt, meist unter 200 nm (Endabsorption). Substitution mit einem Auxochrom wie -OH, -NH₂ oder -Cl kann jedoch eine bathochrome Verschiebung in den untersten Teil der praktisch verwendbaren UV-Region bewirken.

c. Für die toxikologische Analytik ergeben sich aus dieser Übersicht nur wenige allgemeingültige Richtlinien:

Die UV-Spektrophotometrie gestattet die Erkennung von Molekülen oder Molekülteilen mit konjugierten Doppelbindungssystemen, vor allem von Aromaten oder Heteroaromaten. Die Gewissheit, einer solchen Verbindung gegenüberzustehen, ist für den Toxikologen ein ganz wesentlicher Befund, gehören doch ein Großteil der Pharmaka sowie viele andere Substanzen von toxikologischem Interesse zu diesen Körperklassen.

Oft läßt sich weiter erkennen, ob eine aromatische Struktureinheit nur mono-substituiert (Feinstruktur erhalten) oder poly-substituiert (ohne Feinstruktur) ist, ferner, ob ein Chromophor zum Aromaten in Konjugation steht.

An einfacheren Aromaten lassen sich unter Umständen auch die Substitutionsmöglichkeiten durch Auxochrome wie Halogen-Atome, Aminogruppen, Äther-, Hydroxyl- und Sulfhydryl-Gruppen abschätzen. Dabei ist es außerordentlich nützlich, die UV-Spektren nicht nur in einem unpolaren Lösungsmittel aufzunehmen, sondern auch in Wasser bei verschiedenen pH-Werten. Das erlaubt die Erkennung von Phenolen anhand der bathochromen Maxima-Verlagerung beim Alkalisieren, sowie von Aminen anhand der hypochromen Verlagerung beim Ansäuern. Umgekehrt indiziert pH-Unabhängigkeit des UV-spektrometrischen Bildes die Abwesenheit solcher ionisierbaren Gruppen am absorbierenden Kern.

Die Spektren von Heteroaromaten ähneln vielfach denjenigen ihrer isocyclischen Analoge; doch sind sie im Gegensatz zu diesen pH-abhängig.

Der mit UV arbeitende Toxikologe wird sich die Spektralbilder der für ihn wichtigsten cyclischen Molekülbausteine bald merken und durch reine Analogieschlüsse in den verschiedensten Molekülen wiederfinden (z.B. den Nicotinylrest im Nikethamid und im Nicotin oder den enolisierten Barbituratkern in allen Barbitursäuren-Derivaten). Diese Art der "Interpretation" von UV-Spektren ist für die Praxis von sehr großer Bedeutung.

2. Infrarot-Spektroskopie

Im infraroten Spektralbereich messen wir Schwingungs- (Vibrations-)Frequenzen, die in enger Korrelation zu den Strukturparametern stehen. So lassen sich einzelne Bindungen im Molekül erkennen, wodurch diese Methode ein außerordentlich hilfreiches Instrument zur Strukturaufklärung darstellt.

Im Gegensatz zur exakten Theorie, die das Molekül als Ganzes betrachtet und daraus die Schwingungsfrequenzen berechnet, ist es für uns zweckmäßig, rein empirisch vorzugehen. Wir betrachten nur isolierte Atomgruppierungen und versuchen, diesen die entsprechenden Vibrationsfrequenzen zuzuordnen; dabei ist es für uns unwichtig, ob es sich um eine Stretching-, Wagging- oder Rocking-Schwingung handelt. Eine Zuordnung im Bereich zwischen $1000 - 1500 \text{ cm}^{-1}$ ist bei dieser Betrachtungsweise meist nicht möglich, da hier die Banden mehrerer Strukturelemente eng beieinander liegen und so eine eindeutige Aussage verunmöglichen. Ist jedoch die Struktur bekannt, so dient gerade dieser Bereich zur Überprüfung der Identität.

Ohne großen Aufwand und Kenntnisse lassen sich nachstehende Strukturelemente erkennen:

- die Bestätigung der Anwesenheit eines aromatischen Systems,
- die Stellungen der aromatischen Substituenten,
- das Vorliegen von aliphatischen Doppel- oder Dreifach-Bindungen,
- die Anwesenheit von Hydroxylen und von primären und sekundären Aminogruppen,
- die Anwesenheit von Carbonylen und meist auch ihre Bindungsart,
- unter Umständen auch die Anwesenheit von Ätherbindungen und von Nitrogruppen.
- das Vorliegen einer Atomgruppe mit kumulierten Doppelbindungen.

Einige wichtige Atomgruppen, deren IR-Absorptionen für die Strukturaufklärung von Bedeutung sind, haben wir in Tabelle 1 zusammengestellt.

3. Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie, eine schon länger bekannte Analysenmethode, hat erst in neuerer Zeit Bedeutung erlangt. Einerseits konnte durch die verfeinerte Elektronik die Empfindlichkeit der Instrumente verbessert werden und andererseits brachte die Koppelung mit der Gaschromatographie den entscheidenden Schritt zu deren Verwendbarkeit in der Toxikologie. Gerade bei Analysen von biologischem Material läßt sich trotz verfeinerter Extraktionsverfahren nicht vermeiden, daß die Extrakte immer noch Begleitsubstanzen enthalten. Durch die gaschromatographische Trennung wird es möglich, Spektren von einigermaßen einheitlichen Substanzen zu erhalten.

Zur Auswertung von Massenspektren gehen wir folgendermaßen vor:

a. *Erkennung des Molekulargewichtes:*

Das Molekularion M ist - sofern vorhanden - stets der Peak mit der höchsten Masse, wobei man allerdings von den Isotopenpeaks absehen muß, die darauf zurückzuführen sind, daß ein gewisser Anteil der Moleküle schwerere Isotope enthalten. Ist das Molekularion erkennbar, so wissen wir auch das Molekulargewicht unserer Verbindung.

Ein wesentliches Kriterium in der Beurteilung dieses wichtigsten Ions im Spektrum sind die Massendifferenzen mit den nächstunteren Ionen. Sie müssen möglichen Abspaltungen entsprechen, wie z.B.

- M- 1: Abspaltung eines H-Atoms
- M- 2: Abspaltung von H₂
- M-15: Abspaltung einer Methylgruppe
- M-17: Abspaltung von Hydroxyl
- M-18: Wasser-Abspaltung
- M-19: Abspaltung von Fluor
- M-20: Abspaltung von HF
- M-31: Abspaltung von Methoxyl.

Auch ein M-3 Peak kann - wenn auch selten - auftreten. Hingegen sind Differenzen von 4 bis 14 und 21 bis 25 Masseneinheiten mit M nicht möglich. Im Zweifelsfalle kann die für Ionisierung aufgewendete Elektronenenergie (meist 70 eV) bis nahe an das Ionisierungspotential des betreffenden Mole-

Tabelle 1. *Infrarotabsorption*

3650 - 3400 cm^{-1}	(2,75 - 2,94 μ)	Alkohole, Amine, Carbonsäuren (breite Banden)
3100 - 2950 cm^{-1}	(3,23 - 3,38 μ)	C-H Streckenschwingungen
2880 - 2650 cm^{-1}	(3,50 - 3,78 μ)	Aldehyde
2260 - 2100 cm^{-1}	(4,42 - 4,78 μ)	C = C
1770 - 1670 cm^{-1}	(5,65 - 5,98 μ)	Carbonylgruppen: Aldehyde, Ketone, Ester
		Aldehyde:
		1730 cm^{-1} (5,78 μ) aliphatisch
		1700 cm^{-1} (5,88 μ) aromatisch
		1690 cm^{-1} (5,92 μ) ungesättigt
		Ester:
		1770 cm^{-1} (5,65 μ) phenolisch
		1735 cm^{-1} (5,76 μ) aliphatisch
		1700 cm^{-1} (5,88 μ) ungesättigt
		Ketone:
		1745 cm^{-1} (5,73 μ) 5-ring
		1715 cm^{-1} (5,83 μ) aliphatisch
		1690 cm^{-1} (5,92 μ) aryl-
		1675 cm^{-1} (5,94 μ) ungesättigt
1690 - 1650 cm^{-1}	(5,92 - 6,06 μ)	Amide
1640 - 1490 cm^{-1}	(6,10 - 6,75 μ)	Amine
		meist 2 Banden: 1530 - 1640 cm^{-1} (6,54 - 6,10 μ)
		prim.: >1560 cm^{-1} (>6,44 μ)
		sec.: >1580 cm^{-1} (>6,33 μ)
		tert.: fehlt
1600 - 1500 cm^{-1}	(6,25 - 6,67 μ)	Aromaten
900 - 690 cm^{-1}	(11,1 - 14,5 μ)	Aromatische Protonen
		Substitution:
		mono: stark 770 - 730 cm^{-1} (12,85 - 13,70 μ)
		mittel 710 - 690 cm^{-1} (14,08 - 14,5 μ)
		ortho: stark 770 - 735 cm^{-1} (12,85 - 13,6 μ)
		meta: stark 810 - 750 cm^{-1} (12,35 - 13,25 μ)
		mittel 725 - 680 cm^{-1} (13,81 - 14,7 μ)
		para: stark 860 - 800 cm^{-1} (11,6 - 12,5 μ)

küls (meist um oder unter 20 eV) erniedrigt werden. Die Ionenausbeute geht dann allerdings zurück; die relative Intensität von Molekülionen nimmt aber stark zu.

b. *Bestimmung der Anzahl der Kohlenstoff-Atome:*

Der Isotopenpeak $M+1$ stammt im wesentlichen von Molekülen, die ein Kohlenstoff-Atom mit Masse 13 enthalten, das zu rund 1,1 % im natürlichen Kohlenstoff vorhanden ist. Je höher die Kohlenstoffzahl eines Moleküls, umso höher der $M+1$ Peak. Beträgt z.B. die Intensität von $M+1$ 10 % derjenigen von M , so kann das Molekül bis zu 9, ist sie 11 % von M , so kann es höchstens 10 Kohlenstoffatome enthalten (allerdings auch weniger).

c. *Erfassung von weiteren Atomen:*

α. *Stickstoff*

Bei ungerader Massenzahl des Molekülpeaks ist eine ungerade Zahl von Stickstoffatomen (1, 3, 5, ...) vorhanden. Bei geradem Molekulargewicht sind keine oder eine gerade Zahl von N-Atomen (0, 2, 4, ...) enthalten.

β. *Chlor und Brom*

Diese beiden Halogene enthalten einen hohen Anteil von um zwei Masseneinheiten schwereren Isotopen (Tabelle II). Cl- oder Br-haltige Moleküle erkennt man daher an einem intensiven $M+2$ Peak. Dessen relative Intensität zum Molekülion ist rund 33 % für ein Molekül mit einem Cl und 98 % für ein Molekül mit einem Br. Enthält ein Molekül mehrere solcher Halogene, so treten auch relativ hohe $M+4$ und $M+6$ Peaks usw. auf, wobei die Isotopenpeaks intensiver werden können als das Molekülion.

Art und Anzahl der anwesenden Halogene lassen sich anhand der Isotopenpeak-Bilder visuell leicht erkennen (Tabelle 2).

γ. *Sauerstoff und Schwefel*

Auch Schwefel und Sauerstoff sollte man anhand des $M+2$ Isotopenpeaks (Tabelle II) ersehen und eventuell sogar zählen können. Für Schwefel ist

Tabelle 2. *Isotopenhäufigkeit*

M (=100%)	M + 1	M + 2
C ¹²	C ¹³ = 1,11%	---
O ¹⁶	---	O ¹⁸ = 0,2%
S ³²	S ³³ = 0,78%	S ³⁴ = 4,4%
Cl ³⁵	---	Cl ³⁷ = 32,5%
Br ⁷⁹	---	Br ⁸¹ = 97,7%

das bei Abwesenheit von Cl und Br oft möglich. Für eine Erkennung und Zählung der Sauerstoffatome hingegen reicht die Genauigkeit der massenspektrometrischen Intensitätsmessung aber meist nicht aus. In der Praxis machen sich auch recht of Untergrund-Signale störend bemerkbar, so daß auf Peaks von ganz geringer Intensität kein Verlaß ist.

d. *Betrachtung des gesamten Spektralbildes (Spektrrentyp) und Erkennung einzelner Fragmente*

Spektren von Aromaten, konjugierten Olefinen und von gesättigten Ringen besitzen im allgemeinen ein intensives Molekülion und wenig dominierende Fragmente. Dies ist besonders bei kondensierten aromatischen und heteroaromatischen Kernen ausgeprägt. Auch kurzketzige unverzweigte Kohlenwasserstoffe, Äther, Ketone, Aldehyde, Säuren, Amide und Ester ergeben meist gut sichtbare Molekülionen, nicht aber aliphatische Alkohole, Amine und andere N-Verbindungen sowie Moleküle mit stark verzweigten Ketten. In diesen Fällen ist die Fragmentation oft recht komplex.

Eine Reihe von Fragmenten in konstanten Abständen von 14 Masseneinheiten weist auf Anwesenheit aliphatischer Ketten, wobei man aus den Massenzahlen oft auf das Vorliegen einer bestimmten Funktion schließen kann. Aromate machen sich durch Peaks mit m/e 39, 40 bis 53, 63 bis 65 sowie 76 und 77 bemerkbar.

Gewisse Massenzahlen entsprechen einzelnen Atomgruppierungen z.B.

m/e 15: Methylrest
 m/e 29: Äthylrest
 m/e 31: Methoxyfunktion
 m/e 43: Acetylrest
 m/e 91: Benzylrest (Tropylum-Ion).

Die Existenz derartiger Gruppen läßt sich oft auch aus den Massendifferenzen der Fragmente mit M erkennen (siehe unter a Erkennung des Molekulargew.) Zur Erkennung des Spektrrentyps und zur Zuordnung bestimmter Massen zu einzelnen Molekülfragmenten ist eine gewisse Erfahrung notwendig. Dies umso mehr, als auch Umlagerungen auftreten können. Einige wichtige, häufig wiederkehrende Fragmente sind in Tabelle 3 zusammengestellt.

4. NMR-Spektroskopie

Die kernmagnetische Resonanz (NMR) hat in neuerer Zeit einen ungeheuren Aufschwung erfahren. Moderne Strukturaufklärung von komplizierten Molekülen, insbesondere bei der Lösung stereoisomerer Probleme, ist ohne NMR kaum mehr zu bewerkstelligen. Zur Anwendung gelangt vor allem die Protonenresonanz, da der Wasserstoffkern sehr starke Resonanzsignale gibt.

Tabelle 3. *Einige wichtige Fragmente in der Massenspektroskopie*

14: CH ₂	55: C ₄ H ₇
15: CH ₃	56: C ₄ H ₈ , C ₃ H ₄ O
18: H ₂ O	57: C ₄ H ₉
19: F	58: C ₃ H ₈ N, CH ₃ COCH ₂
26: CN	69: C ₅ H ₉
27: C ₂ H ₃	70: C ₅ H ₁₀
28: C ₂ H ₄ , CO, N ₂	71: C ₄ H ₉ N
29: C ₂ H ₅	72: C ₄ H ₁₀ N
30: CH ₂ NH ₂ , NO	77: C ₆ H ₅
31: OCH ₃ , CH ₂ OH	79: Br (dazu 81)
35: Cl (dazu 37)	86: C ₅ H ₁₂ N
39: C ₃ H ₃	91: C ₆ H ₅ -CH ₂
42: C ₃ H ₆ , CH ₂ CO	92: C ₆ H ₅ N-CH ₂
43: CH ₃ CO, CONH	105: C ₆ H ₅ -CO, C ₆ H ₅ -CH ₂ CH ₂
44: CO ₂ , C ₂ H ₄ NH ₂	119: CH ₃ -C ₆ H ₄ -CHCH ₃ , CH ₃ C ₆ H ₄ -CO

Atomkerne tragen eine Ladung, sie verhalten sich wie Kerne mit einem mechanischen Spin, wie kleine Elektromagnete.

Werden Atomkerne in ein homogenes, starkes Magnetfeld (10'000 - 20'000 Gauss) gebracht, so treten je nach dem Energieniveau Veränderungen im System der Kerne ein, welche wir ausmessen können. Aus den NMR-Spektren können wir folgende zwei Informationen erhalten:

- Bindungsart der Wasserstoffatome: Aus der chemischen Verschiebung (chemical shift, meist in ppm bezogen auf TMS angegeben) lassen sich Atomgruppierungen erkennen. In Tabelle 4 sind die Werte für einige wichtige Atomgruppen zusammengestellt.
- Aus der Feinstruktur der Banden (Spin-Spin-Wechselwirkung) lassen sich die benachbarten Wasserstoffatome erkennen. Je nach ihrer Zahl spalten sich die Banden in Duplette, Triplette oder Multiplette auf. Gerade diese Informationen helfen uns, Isomere und andere verwandte Strukturen zu erkennen. So wird z.B. eine Methylgruppe von einer Methoxygruppe CH₃-O- als Singlett erscheinen. Hingegen wird die Methylgruppe einer Allyl-Seitenkette CH₃-CH=CH- in ein Duplett aufspalten.

Tabelle 4. Kernresonanzspektroskopie

Chemische Verschiebungen von Protonen in ppm, bezogen auf Tetramethylsilan			
-C-CH ₃	0,8 - 1,1	-CO-O-CH ₂ -	4,0 - 4,5
-C=C-CH ₃	1,5 - 1,7	C ₆ H ₅ -O-CH ₂ -	4,3 - 4,8
CH ₃ -CO-	2,0 - 2,5	-CH = C-	4,5 - 5,5
CH ₃ -N<	2,2 - 2,6	C ₆ H ₅ -OH	4,5 - 6,5
C ₆ H ₅ -CH ₃	2,2 - 2,4	-CO-NH-	5,5 - 7,5
-CO-CH ₂ -N<	3,2 - 3,5	Aromat,-H	6,5 - 8,0
C ₆ H ₅ -NH-	3,2 - 5,5	C ₆ H ₅ -NH-CO	7,5 - 8,7
-CO-CH ₂ -CO-	3,3 - 3,6	-O-CHO	8,0 - 8,2
-O-CH ₃	3,3 - 4,0	aliphatic.-CHO	9,5 - 9,9
-CH ₂ -O-	3,4 - 4,0	aromat.-CHO	9,6 - 10,0
-CH ₂ -Cl	3,4 - 3,7	-COOH	11,5 - 13,0
CH ₃ -O-CO-	3,6 - 4,0		

Ein wesentlicher Nachteil der NMR-Spektroskopie besteht für uns Toxikologen darin, daß zur Aufnahme des Spektrums relativ viel Substanz benötigt wird. Diese Menge steht uns nicht immer zur Verfügung. Besitzen wir aber genügend Substanz - sie wird bei der Spektrenaussmessung nicht zerstört -, so lohnt sich die Arbeit für ein NMR-Spektrum.

II. KOMBINIERTE AUSWERTUNG AN BEISPIELEN

1. Beispiel Nr. 1

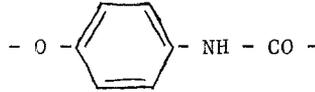
In Abb. 1 sind die Angaben für das UV- und IR-, sowie das Massenspektrum und NMR-Spektrum zusammengestellt.

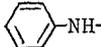
UV: Die intensive Bande bei 250 nm stammt von einem aromatischen Ring, der von einem elektronegativen Substituenten beeinflusst ist. Daneben ist eine schwache Radikalbande sichtbar.

IR: 3500 cm⁻¹ (2,8 μ): -OH oder -NH-Gruppe
 1555 + 1655 cm⁻¹ (6,0 + 6,4 μ): Amidgruppe -CONH-
 1500 + 1600 cm⁻¹ (2,2 + 6,6 μ): Aromat
 1060 + 1243 cm⁻¹ (9,54 + 8,03 μ): vermutlich von einem aromatisch-aliphatischen Äther (Aromat-O-C)
 830 + 840 cm⁻¹ (11,9 + 12,1 μ): p-substituierter Aromat

Kombinierte Spektroskopie

Wir stehen einem p-substituierten Aromaten gegenüber, der eine Amidgruppe und vermutlich eine aromatische Äthergruppe besitzt. Das erlaubt uns folgende Struktur aufzustellen:



- MS: M = 179: Der Molekülpeak ist ungeradzahlig, die Substanz enthält Stickstoff.
 M + 1: 11,1 % von M. Die Anzahl der C-Atome beträgt maximal 10,
 M + 2: Die Intensität ist gering. Die Verbindung enthält kein Chlor, Brom oder Schwefel.
 52, 53, 63: Aromat
 43: Acetylgruppe
 28: sauerstoffhaltige Fragmente (CO)
 29: Äthylgruppe
- 91: Benzylrest oder Anilinrest 
 108: Basispeak, stammt vom Rest: 
 137: Abspaltung des Acetylrests vom Molekülion
 108 = 137 - 29; Abspaltung einer Äthylgruppe.

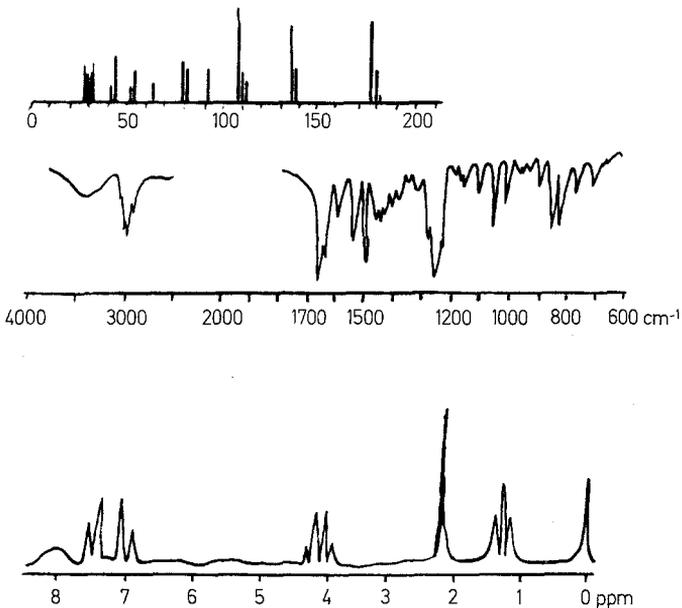


Abb. 1. Analytische Daten des Beispiels 1

UV: breites Maximum bei 250 nm (wenig intensives Max. nahe 290 nm)

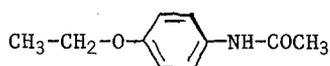
IR: 1655, 1555, 1513, 1243, 840, 830 cm^{-1}

MS: 27-30, 43, 52-53, 80-81, 91, 108, 137, 179

P 179 = 100 %, P+1 = 11,1%, P+2 = 1,4 %

NMR: Integral = 1:2 : 2: 2 : 3 : 3

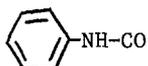
Wir können nun die Strukturformel aufstellen:



Dies entspricht dem Analgeticum Phenacetin.

NMR: Zur Überprüfung betrachten wir noch das NMR-Spektrum. Eine Auswertung unter Zuhilfenahme der Tabelle 4 bestätigt uns die Strukturformel von Phenacetin:

8 (breit) ppm stammt von der arom. Amidgruppe



7,4 u. 7,0 ppm:

zwei Duplette von aromatischen Protonen
bei p-Substitution

4,0 ppm:

CH₂ zwischen einer Methylgruppe und Sauerstoff:
CH₃-CH₂-O- (Quadruplett).

2,1 ppm:

von der Methylgruppe des Acetylrests (Singlett)

1 ppm:

Methylgruppe des Äthoxyrestes (Triplett).

2. Beispiel Nr. 2

Analytische Daten: basischer Extrakt

UV: kleine Maxima bei 252, 258 und 264 nm

IR: starke Banden bei 690, 750, 1148, 1166, 1218, 1708 cm⁻¹

MS:	57 (50%)	105 (15%)	218 (35%)
	71 (100%)	174 (25%)	232 (10%)
	91 (15%)		247 (60%)

UV: Typisches Spektrum eines von Substituenten unbeeinflussten Aromaten.

IR: 1500 und
1600 cm⁻¹

Aromat

750 und
690 cm⁻¹

Monosubstitution

1708 cm⁻¹

Carbonylgruppe

Aldehyde sind ausgeschlossen, da die Bande zwischen
2500 und 2700 cm⁻¹ fehlt.

Ketone: für aromatische Ketone etwas hoch, würde eher
zu aliphatischem Keton passen.

Ester: wäre möglich, Bande etwas tief, aber die beiden
bei Estern vorhandenen sym. und asym. Streck-
schwingungen zwischen
1100 bis 1250 cm⁻¹ sind sehr stark.

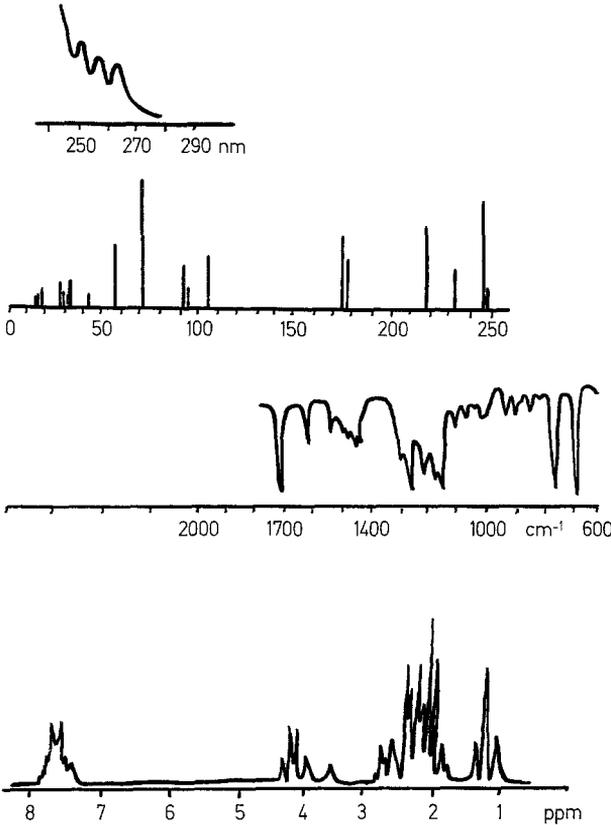
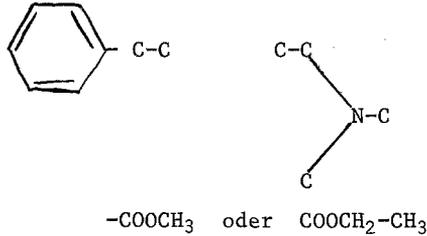


Abb. 2. Analytische Daten des Beispiels 2

- MS*: 247 = M Enthält ungerade Zahl N-Atome. Im IR-Spektrum fehlen Banden zwischen 1500 - 1650 cm^{-1} (Amide oder prim. sec. Amine), also muß ein tertiäres Amin vorliegen.
- 232 (M - 15) Methylgruppe
- 218 (M - 29) Äthylgruppe
- 57 und 71 = Basision 71. Es handelt sich um die Fragmente der tert. Aminogruppe $\text{C}_3\text{H}_7\text{N}$ bzw. $\text{C}_4\text{H}_9\text{N}$.
- 174 (M - 73) Abspaltung eines Carbaethoxy-Restes, der an einer leicht spaltbaren Bindung sitzt.

NMR: Im NMR-Spektrum erkennt man deutlich bei 7,4 ppm die aromatischen Protonen, die Signale bei 1,2 ppm (C-CH₃) und 4,1 ppm (O-CH₂-) stammen von einer Äthylestergruppierung. Schwieriger gestaltet sich die Deutung der Multiplette zwischen 1,9 - 2,6 ppm, da sich hier einige Signale überlagern. Sie dürften von den Substituenten der tertiären Aminogruppe herrühren, eine genaue Differenzierung ist kaum möglich.

Wir haben nun folgende Bruchstücke zusammenzufügen:



Berechnung der Summenformel:

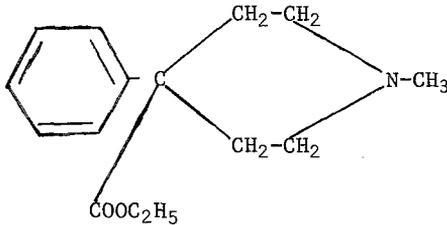
Ziehen wir vom Mol-Gewicht 20 (aus Esterbindung) und 1 N (aus Amin) ab, so verbleiben 201 für C und H.

C₁₄H₃₃ enthält zu viel Wasserstoff, da Aromat nachgewiesen ist, und

C₁₅H₂₁ vernünftig, hingegen besitzt

C₁₆H₉ zu wenig Wasserstoff.

Die Summenformel lautet demnach C₁₅H₂₁O₂N, das ergibt die Formel des Analgeticums Pethidin



3. Beispiel Nr. 3

Analytische Daten:	basischer Extrakt		
UV:	kleines Max. bei 279 nm, Schulter bei 272 nm, starkes Maximum bei 228 nm		
IR:	starke Banden bei 780, 850, 1174, 1605, 1690 cm ⁻¹ mittlere Banden bei 900, 1100, 1180, 1400, 1550, 1640, 3200 cm ⁻¹ und 3400 cm ⁻¹ (Doppelbande)		
MS:	28-32 (10-25%)	86 (100%)	120 (30%)
	42 (20%)	92 (12%)	137 (5%)
	58 (30%)	99 (25%)	
	65 (15%)	110 (10%)	164 (8%)

UV: Aromatisches Ringsystem, das von elektronegativen Substituenten beeinflusst ist.

IR: 3400 cm⁻¹ Doppelbande von prim. Amin (weitere Bande bei 3200 cm⁻¹)
 1500 und 1605 cm⁻¹ Bestätigung des Aromaten
 780 und 820 cm⁻¹ p-Substitution
 1640 cm⁻¹ zusammen mit der Doppelbande bei 3400 cm⁻¹, könnte von einer prim. Aminogruppe herrühren

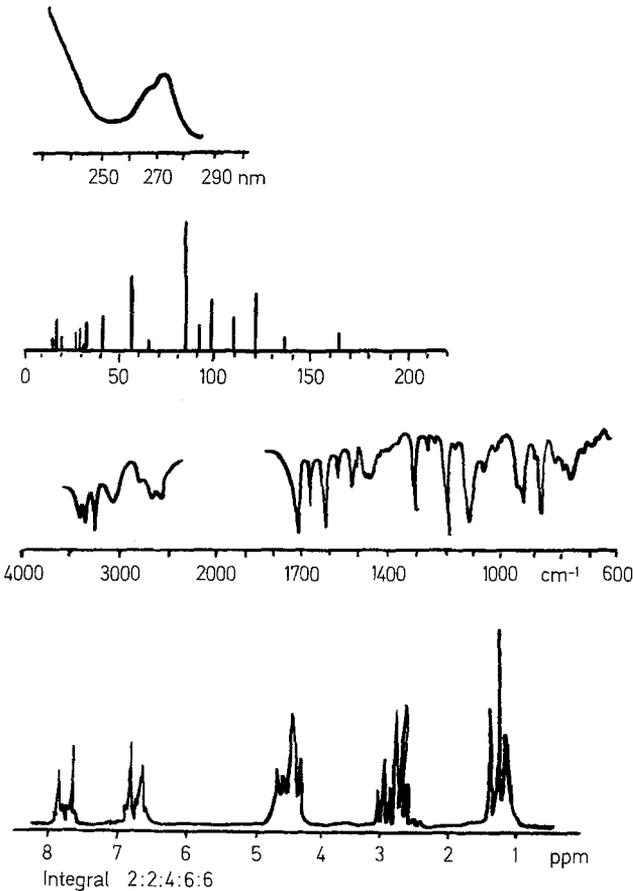


Abb. 3. Analytische Daten des Beispiels 3

1690 cm^{-1} Carbonylfunktion, keine Aldehydgruppe, Ketongruppe nur an stark ungesättigtem System möglich, stammt eher von aromatischem Ester (Benzoessäureesterderivat) (vgl. auch 1100 - 1174 cm^{-1}).

MS: 164 Kein Molekülpeak, da die Differenz zu den nächsten Fragmenten 137 und 120 keine üblichen Abspaltungen sind.

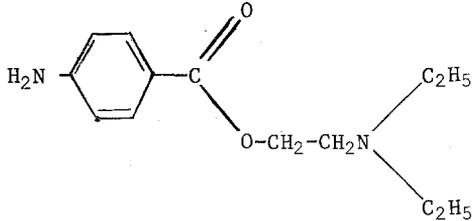
86 Basispeak. $\text{C}_5\text{H}_{12}\text{N}$ -Gruppe, dazu paßt auch 58 (besitzt 2 C-Atome (Äthylgruppe) weniger).

92 und 120 Könnte von einem Aminophenylrest stammen ($\text{C}_6\text{H}_5\text{NH}$), der Peak bei 120 wäre dann das Bruchstück von einem p-Aminobenzoessäureester ($\text{H}_2\text{N}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CO}$).

NMR: Das NMR-Spektrum zeigt bei 7,8 und 6,6 ppm die aromatischen Protonen (p-Substitution), ebenso sind bei 4,4 ppm die Protonen der Methylengruppe eines Esters enthalten. Bei 1,1 ppm sind zwei endständige Methylgruppen (Diaethylgruppe) zu erkennen. Die Protonen der aromatischen Aminogruppe

dürften im Signal der Estermethylen-Gruppe bei 4,4 ppm enthalten sein, was auch aus dem Integral (bei 4,4 ppm, 4 Protonen) hervorgeht.

Wir müssen nun noch die beiden Bruchstücke - den p-Aminobenzoerest und das tert. Amin (C_6H_5N) - zusammenhängen, z.B. über eine Esterbrücke. Nach Hinzufügen einer weiteren CH_2 -Gruppe kommen wir zum Lokalanästhetikum Procain (Mol.Gew. 236):



III. KOMBINATION VON FRAKTIONIERUNGSVERFAHREN MIT INSTRUMENTELLEN IDENTIFIKATIONSMETHODEN

Die angeführten Beispiele zeigen, wie mit dem Zusammenspiel der vier instrumentalanalytischen Methoden unerwartete und unbekannte Substanzen identifiziert werden können. Diese Art Spektrenauswertung wird heute an den meisten Hochschulen gelehrt und geübt. Für die spätere praktische Verwendung ist diese Schulung allerdings oft etwas allzu akademisch. Man vergißt, darauf hinzuweisen (und dies auch mit Beispielen zu belegen), daß die moderne Instrumentalanalytik auch zusammen mit klassischen Methoden wie z.B. Schmelzpunktsbestimmungen oder Elementaranalysen und auch mit chromatographischen Trenndaten verwendet werden kann. Es wird auch nicht darauf hingewiesen, daß die instrumentellen Methoden eine Abtrennung und Isolierung der zu identifizierenden Verbindungen bedingen, und daß ihr Einsatz sehr stark von den verwendeten Fraktionierungsverfahren und der Reinheit der anfallenden Komponenten abhängig ist.

1. Quantitative Aspekte

Wir Praktiker, die wir uns tagtäglich mit Problemen der Abtrennung und der Reindarstellung befassen müssen, wissen, daß die zu Identifikationszwecken benötigten analytischen Daten

- meist nur nach erfolgter Isolierung einer Verbindung beschafft werden können,
- oft nur bei gutem Reinheitsgrad der abgetrennten Komponente zuverlässige Informationen ergeben,
- bei gewissen Identifikationsverfahren wie z.B. NMR nur bei Vorliegen von relativ viel Substanz erhältlich sind.

Was sind nun die Substanzmengen, welche die vorerwähnten instrumentalanalytischen Methoden benötigen? In der folgenden Übersicht geben die Zahlen außerhalb der Klammer diejenigen Mengen an, die ein Normalgerät verlangt. Die Zahlen in Klammern sind diejenigen Stoffmengen, die mit Ultramikro-Technik noch

analysierbar sind. Da die Nachweisempfindlichkeit strukturabhängig ist, können die angegebenen Werte je nach Substanztyp ziemlich stark variieren.

NMR	10 mg	(1 mg)
Mikro-Elementaranalyse	1 mg	
Ultraviolett	10 µg	(1 µg)
Infrarot	10 µg	(1 µg)
Massenspektrometrie	100 ng	(10 ng)
Spektrofluorimetrie	10 ng	(1 ng)

Wir sehen aus diesen Zahlen, daß die NMR bereits mehr Substanz benötigt als eine Mikro-Elementaranalyse. Der Toxikologe wird daher selten in die Lage kommen, dieses Verfahren zu benutzen. Er wird sich dafür umso mehr auf Massenspektrometrie, Infrarot- und Ultraviolett-Spektroskopie abstützen müssen. Bei der Arbeit mit Infrarot wird vorausgesetzt, daß mit Mikropillen und Strahlengang-Kondensator gearbeitet wird. In Bezug auf Empfindlichkeit sind Massenspektrometrie und Spektrofluorimetrie die günstigsten Verfahren. Der Anwendungsbereich der Massenspektrometrie in der Toxikologie ist fast unbegrenzt, während nur ein geringer Anteil der uns interessierenden Substanzen fluoresziert und wenig Information über Korrelation zwischen Spektralfluorimetrie und chemischer Konstitution verfügbar ist.

2. Ansprüche an die Reinheit

Auch in Bezug auf Reinheit der isolierten Komponenten stellen die instrumentalanalytischen Methoden sehr verschiedene Anforderungen. Am bescheidensten ist die Ultraviolett-Spektroskopie. Sie läßt sich schon für das "screening" von relativ unreinen Extrakten verwenden und ist in der Lage, nicht nur organische, sondern auch wässrige Lösungen zu analysieren. Da UV-Spektren sehr oft pH-abhängig sind, sollten alle Extrakte mit ionisierbaren Inhaltsstoffen bei verschiedenen pH-Werten im UV aufgenommen werden.

IR, NMR und MS stellen höhere Anforderungen an die Reinheit der Komponenten. Diese sollte mindestens 95 % betragen, besser noch 99 %. Je unreiner eine isolierte Substanz, desto mehr Kenntnisse und Erfahrung erfordert die Auswertung der anfallenden Spektren. Je unvollkommener die Daten aus einer instrumentellen Methode, desto stärker müssen sie durch andere Verfahren gestützt werden.

Während UV-Spektroskopie schon mit den Extrakten aus den flüssig-flüssig Fraktionierungsschritten betrieben werden kann, erfordern die anderen instrumentellen Identifikationsverfahren weitere Reinigungsoperationen, wie

- Kristallisation oder bei nicht kristallisierenden Komponenten wiederholte Fällung,
- fraktionierte Sublimation,

- Destillation ohne oder mit Wasserdampf
- kolonnen-chromatographische Trennungen, die auf Adsorption, Verteilung, Ionenaustausch oder Molekulargewichtsverteilung beruhen,
- gaschromatographische Trennungen, sowohl auf Adsorptions- wie auch auf Verteilungs-Grundlage.

Bei der Suche nach einem unbekanntem Pharmakon extrahiert der Toxikologe meist saure Verbindungen, Neutralstoffe, Basen und amphotere Wirkstoffe getrennt. Eventuell unterteilt er sogar den sauren Auszug in starke und schwache Säuren. Die Extrakte werden UV-spektroskopisch untersucht, sowohl im organischen Lösungsmittel wie auch (mit Ausnahme der Neutralextrakte) in wässriger Lösung bei drei verschiedenen pH-Werten. Die in den sauren und neutralen Extrakten anfallenden Pharmaka lassen sich oft durch Kristallisation oder Sublimation in hoher Reinheit darstellen. Das erweist sich als günstig für die anschließenden Untersuchungen mit IR und MS. Die basischen und amphoteren Extrakte hingegen, sowie die Extrakte nach Hydrolyse, liefern selten kristallisierbare oder sublimierbare Komponenten. Sie müssen meist mit Dünnschichtchromatographie, mit Gaschromatographie oder mit Säulenchromatographie gereinigt werden. In diesen Fällen ist es sehr wichtig, wie das chromatographische Trennverfahren mit den spektroskopischen Identifikationen verbunden wird.

3. "Off-Line"-Kombinationen

Die Koppelung von Trennverfahren mit Identifikationsverfahren muß heute von den meisten Toxikologen "off-line" betrieben werden. Die abgetrennten Komponenten sind zuerst in Substanz zu fassen und können erst dann an die Identifikationsgeräte weitergegeben werden. Das ist gar nicht immer so einfach, handelt es sich doch meist um Mikrogramm-Quantitäten oder sogar Sub-Mikrogramm-Mengen.

Bei der Säulenchromatographie liegen die Verhältnisse wohl am einfachsten. Die eluierten Fraktionen können durch nach Zeit, Volumen oder Tropfenzahl gesteuerten Kollektoren aufgefangen werden. Regelt man die Auffangvolumina durch den Schreiber des verwendeten Detektors (z.B. UV-Detektor, Refraktometer oder "moving-wire"-Detektor), so spiegelt sich die erzielte Trennung in den erhaltenen Fraktionen wieder. Für einige Identifikationsmethoden ist anschließend noch eine Entfernung oder Ersetzung des Lösungsmittels notwendig.

Bei dünn-schichtchromatographischen Analysen müssen die abgetrennten Substanzflecken vor der spektrometrischen Analyse durch Extraktion aus der Trennschicht isoliert werden. Bei einer nachfolgenden Aufnahme des UV-Spektrums ist das wenig problematisch. Für IR- und MS-Spektren hingegen sind normalerweise zu viele Verunreinigungen vorhanden. Eine zusätzliche Reinigungsoperation ist an-

Kombinierte Spektroskopie

gezeigt, erfordert aber oft viel Zeit und kann Substanzverluste mit sich ziehen.

Das Auffangen von gaschromatographisch aufgetrennten Fraktionen ist bedeutend leichter als vielfach angenommen. Durch die Instrumenten-Firmen werden relativ teure Auffangsysteme angeboten, welche für uns unnötig sind. Die besten Erfahrungen haben wir mit dem in Abb. 4 gezeigten Vorgehen gemacht:

Die Trennkolonne mündet in einen Stromteiler, der sich noch im Kolonnenofen befindet und das Eluat in einem ungleichen Verhältnis (z.B. 10:1 oder 30:1) aufspaltet. Der kleinere Gasfluß mündet in einen Detektor (z.B. FID), der größere führt durch die Ofenwand über eine Koppelungsstelle ins Freie. Zeigt der Detektor das Erscheinen einer Komponente an, so wird hier eine Glaskapillare aufgesteckt. Der Temperaturabfall beim Austritt aus dem heißen Ofen bewirkt meist eine fast vollständige Kondensation an der Kapillarwandung. Eine zusätzliche Kühlung ist nur bei ganz leicht flüchtigen Verbindungen notwendig, sonst aber unangebracht, weil sie zu Nebelbildung und damit zu Substanzverlusten führt. Das Kondensat im Kapillarröhrchen kann von Auge oder mittels einer Lupe erkannt werden. Es läßt sich mit einigen ml Lösungsmittel in eine Quarzzone

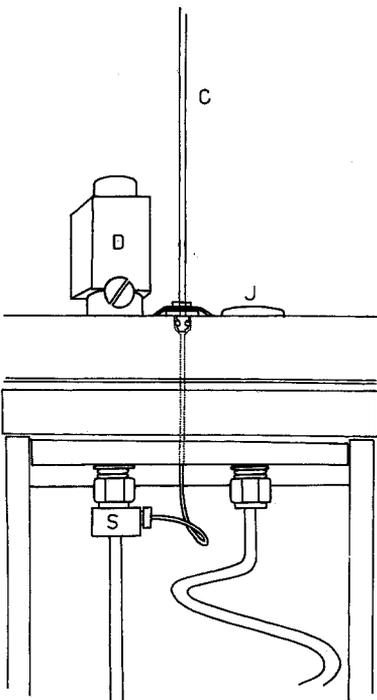


Abb. 4. Auffangvorrichtung von gaschromatographischen Fraktionen

spülen und UV- oder fluoreszenz-spektroskopisch analysieren. Das Kondensat kann auch mit einigen Tropfen Chloroform direkt auf eine vorbereitete Portion Kaliumbromid gewaschen und in eine Mikropille verarbeitet werden für die IR-Aufnahmen. Auf diese Weise lassen sich gut auswertbare IR-Spektren schon ab 1 µg Kondensat erzielen. Auch für die Massenspektrometrie sind solche Kondensate geeignet. Die Kondensationsstelle des Röhrchens wird herausgeschnitten und über den Direkteinlass in das Hochvakuum des Massenspektrometers eingeschleust.

4. "On-Line"-Kombination

Natürlich ist es eleganter, die Kombination von Fraktionierungsverfahren und Identifikationsverfahren "on-line" durchzuführen, d.h. ohne daß ein Auffangen der chromatographisch getrennten Fraktionen notwendig ist. Dieses Problem ist heute bereits für die Koppelung Gaschromatographie-Massenspektrometrie gelöst. Das ist eigentlich erstaunlich. Wohl handhaben diese beiden Methoden vergleichbare Substanzmengen; während aber die Gaschromatographie bei Überdruck arbeitet, funktioniert die massenspektrometrische Analyse im Hochvakuum. Das Kombinationsverfahren ist deshalb apparativ sehr aufwendig, bürgert sich aber dennoch in toxikologischen Untersuchungslaboratorien ein. Sein Einsatz hat in wenigen Jahren bereits außerordentliche Erfolge gezeitigt.

Die Versuche zur direkten Koppelung von GC mit IR haben erst in allerneuester Zeit zu leistungsfähigen Instrumenten geführt, deren praktische Bewährung aber noch aussteht. Interessant sind auch die neuesten Entwicklungsarbeiten über die Koppelung von Hochdruck-Kolonnenchromatographie mit auf chemischer Ionisation basierender Massenspektrometrie.

Bei der heutigen Renaissance der Säulenchromatographie fällt auf, daß die "on-line"-Koppelung dieser Trenntechnik mit Spektrometrie nicht vermehrt und schnellen Eingang findet. UV- und Fluoreszenz-Monitoren werden zwar als Detektoren benutzt, registrieren jedoch meist nur eine bestimmte Wellenlänge als Funktion der Zeit; auf eine kontinuierliche Ausmessung des ganzen Wellenbereichs wird verzichtet.

"On-line"-Kombinationen von Fraktionierungs- und Identifikations-Methoden sind elegant, aber teuer und reparaturanfällig. Nicht jedes toxikologische Laboratorium wird in der Lage sein, solche Installationen zu kaufen und zu warten. Dazu möchten wir doch bemerken, daß die "on-line"-Koppelung nicht immer eine Zeitersparnis bedeutet gegenüber der "off-line"-Kombination. So kann man z.B. bei der letzteren eine aufgefangene Fraktion verschiedenen Identifikationsgeräten zuführen und sich mit dem notwendigen Mehraufwand für die Isolierung der Substanz auch bedeutend mehr analytische Informationen beschaffen.

IV. AUS DER PRAXIS ENTNOMMENE BEISPIELE FÜR ISOLIERUNG UND IDENTIFIKATION

1. Beispiel Nr. 4: Untersuchung einer wässrigen Lösung

Bei einer Kontrolle auf Suchtmittel wurde u.a. ein Tropffläschchen mit farb-
loser Flüssigkeit behändigt, deren Zusammensetzung aufzuklären war.

Die wässrige Lösung wurde extrahiert, mit Gliederung in stark saure, schwach
saure, neutrale, basische und amphotere Komponenten (Lösungsmittel Äther, für
amphotere Komponenten methanolhaltiges Chloroform). Die Hauptanteile der lös-
lichen Verbindungen verblieben im schwach sauren und im amphoteren Extrakt.

a. Die UV-Spektren des schwach sauren Extraktes in Wasser bei verschiedenem
pH gibt Abb. 5 wieder. Durch GC-MS (Trennkolonne mit 2,5 % Apiezon L) konnte
diese Fraktion in 2 Komponenten aufgespalten werden. Der erste der beiden

Spektren des sauren Extraktes von Beispiel Nr. 4

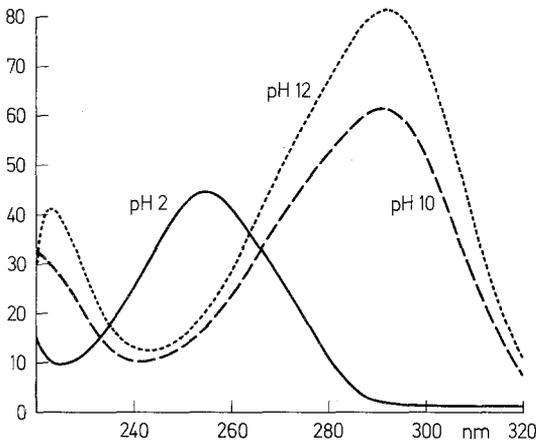


Abb 5a. UV-Spektren bei pH 2, 10, 14 (Wasser)

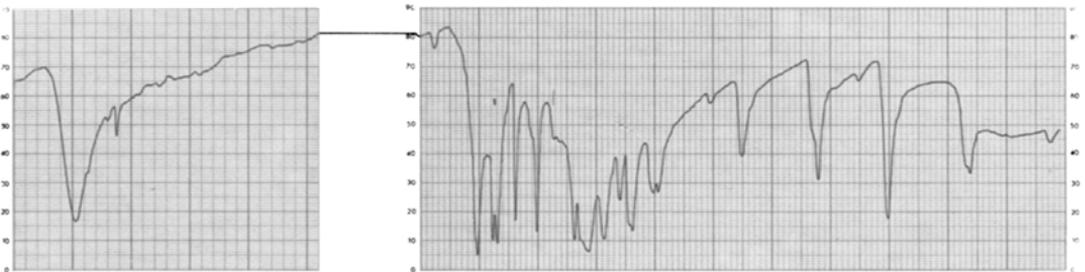
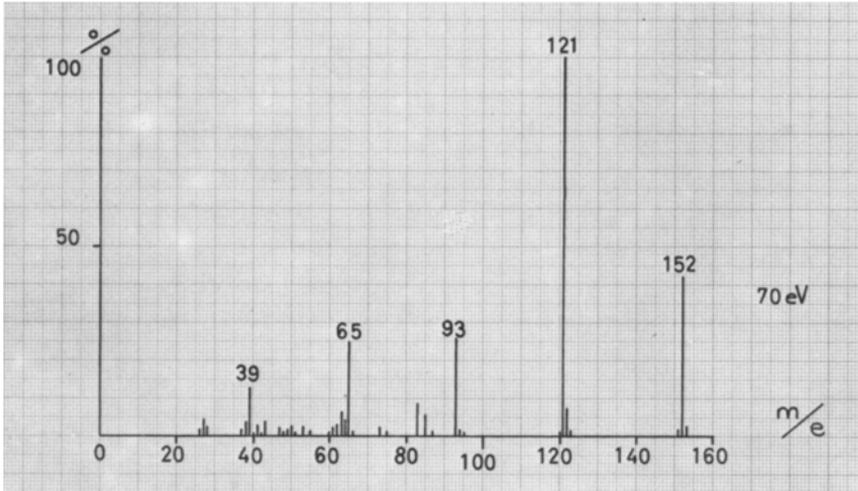
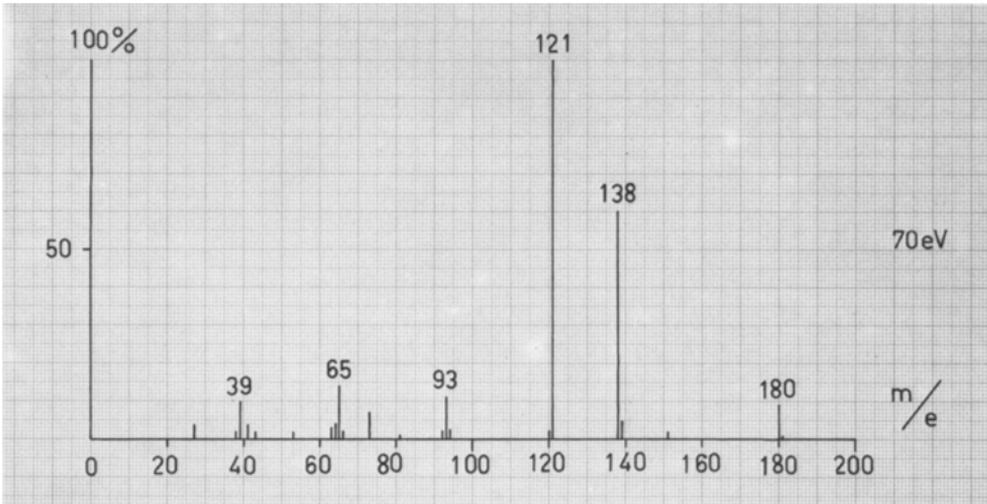


Abb.5b. IR-Spektrum (KBr)



5c. Massenspektrum (1. Komponente)



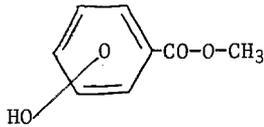
5d. Massenspektrum (2. Komponente)

Peaks wurde zudem beim Kolonnenaustritt aufgefangen und IR-spektrophotometrisch analysiert.

Die Interpretation ergibt

UV: Mindestens zweifach substituierter Aromat mit phenolischem Hydroxyl, bei pH 7,3 bereits ionisiert.

Formel



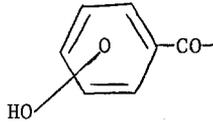
MS der zweiten Komponente:

M = 180 \rightarrow keine oder gerade Zahl N-Atome.

M+2 klein \rightarrow Cl, Br und S fehlen.

Hauptfragmente (Außer m/e 138) wie bei erster Komponente \rightarrow strukturähnliche Verbindung.

Basispeak 121 (wie in erster Komponente) weist auf Rest



Masse 138 entspricht der Hydroxybenzoesäure, Verbindung mit M = 180 dem Isopropylester.

IR: Bestätigung von

- phenolischem Hydroxyl (Banden um 3 μ sowie bei 7,6 und 8,1 μ),
- Ester Carbonyl (intensive Banden bei 5,95 μ und 7,85 μ).

Der aromatische Substitutionstyp geht aus dem langwelligen Bereich nicht eindeutig hervor. Die vier scharfen Banden zwischen 6 und 7 μ sprechen für p-Substitution.

Beide Verbindungen sind Ester der p-Hydroxy-benzoesäure:

- b. Die Substanz im Chloroformextrakt (die sich in kleinerer Konzentration auch in einigen anderen Extrakten fand) konnte zur Kristallisation gebracht werden. Ihre UV-Spektren in Wasser wie auch ihr MS-Spektrum sind in Abbildung 6 wiedergegeben.

Interpretation

UV: heteroaromatisches System (pH-abhängige B-Bande mit Max. um 260 nm), erinnert an Nicotinyl-Rest.

MS: M = 178 \rightarrow gerade Anzahl N.

M+1 = 11,5 % von M \rightarrow 10 C.

M+2 = 1,5 % von M \rightarrow Cl, Br, S.



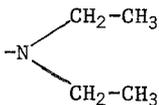
Die restlichen 72 Masseneinheiten enthalten mindestens 1 N \rightarrow C₄H₁₀N.

m/e 163 = M-15 \rightarrow Abspaltung von Methyl

m/2 149 = M-29 \rightarrow Abspaltung von Äthyl

m/e 134 = M-(15+29) \rightarrow gleichzeitige Abspaltung von Methyl und Äthyl.

Alle diese Bedingungen erfüllt der Rest



IR: Besitzt starke Amidbande um 6,1 μ , die die Anwesenheit von Nicotinsäure-diäthylamid bestätigt.

MS der ersten Komponente:

M = 152 \rightarrow keine oder gerade Anzahl N-Atome.

M+2 unter 4 % \rightarrow Cl, Br, S fehlen.

Abspaltung von 31 \rightarrow Methoxyl.

Abspaltung von 59 (= 31 + 28) \rightarrow Methylester.

Das verbleibende Fragment 93 muß den Benzolkern mit dem Hydroxyl enthalten.

Spektren der amphoteren Substanz von Beispiel Nr. 4

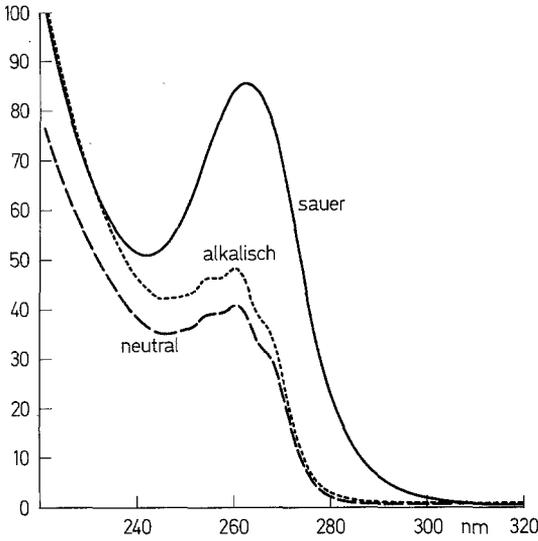


Abb. 6a. UV-Spektren (Chloroformextrakt)

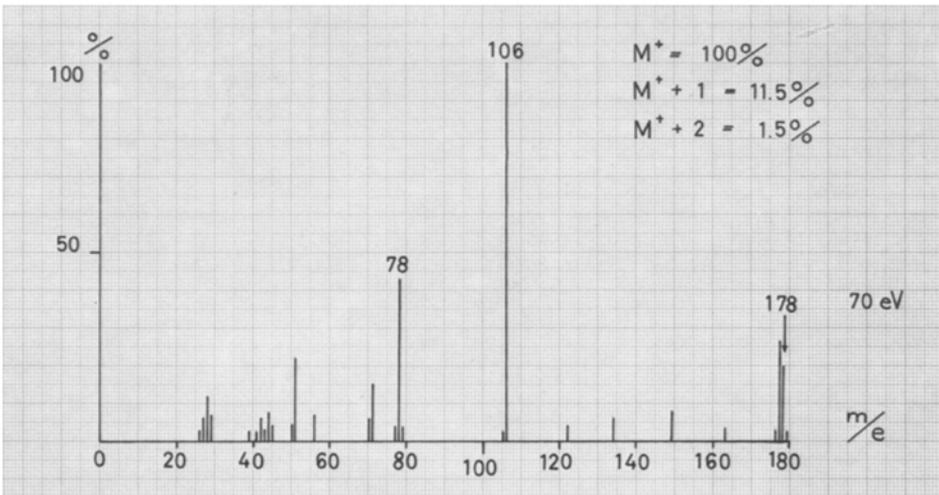


Abb. 6b. Massenspektrum

Die Lösung im Tropffläschchen enthielt demnach Nikethamid sowie ein Gemisch von Methyl- und Isopropylester der p-Hydroxy-benzosäure (sogenannter Reproester, ein Konservierungsmittel).

2. Beispiel Nr. 5: Suche nach einem Sedativum und Konvulsivum in Körperflüssigkeiten (Blut, Urin)

Der Fraktionierungsgang umfaßte Ätherextraktionen der sauren und der alkalischen Körperflüssigkeiten, dann eine Chloroform-Ausschüttlung bei pH 8. Die organischen Auszüge wurden durch flüssig-flüssig Extraktionen gereinigt und dabei zum Teil noch so gegliedert, daß die stark sauren, schwach sauren, neutralen, basischen und amphoteren Wirkstoffe in getrennten Fraktionen vorliegen mußten.

Spektren zum Beispiel Nr. 5 (basische Komponente aus Blut)

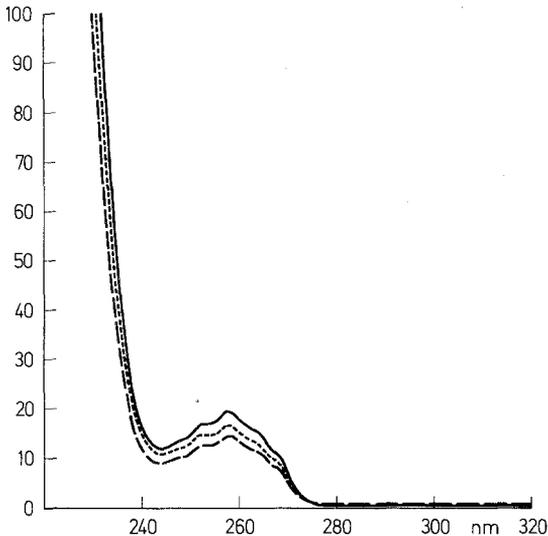


Abb. 7a. UV-Spektren (Wasser)



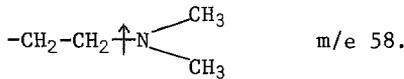
Abb. 7b. IR-Spektrum (KBr)

Abb. 7c. Massenspektrum (durch GC/MS)

m/e	% I
45	7
57	3
58	100
59	4
152	4
165	9
166	4
167	10
168	5
227	2
255 = M	0,5

UV: Bei der UV-spektrophotometrischen Kontrolle der Extrakte (in organischer Lösung und in Wasser) ergab nur der basische Ätherauszug einen auffallenden Befund. Er ist vereinbar mit der Anwesenheit einer Verbindung mit Phenyl- oder Benzyl-Rest (pH-unabhängige B-Bande).

MS: Mit GC-MS (Trennkolonne SE-30) ließ sich aus dem basischen Extrakt eine in beträchtlicher Konzentration anwesende Komponente isolieren und massenspektrometrisch charakterisieren. Das Basisfragment mit Masse 58 ist vereinbar mit der Anwesenheit eines Dimethylaminoäthyl-Restes:

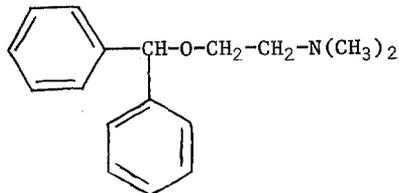


Das Molekülion (255) ist wenig intensiv und erlaubte keine Bestimmung der C-Zahl anhand der Isotopenpeaks. 0,6 mg Substanz wurden daher mit GC gereinigt, im Kapillarrohr aufgefangen und elementaranalytisch auf C analysiert (H-Bestimmung zu ungenau). Der C-Gehalt von rund 80 % zeigt, daß unser Molekül 17 C-Atome enthält. Die Zahl der N-Atome muß ungerade sein.

IR: Aus dem IR-Spektrum, aufgenommen mit einem weiteren gaschromatographischen Kondensat, ergibt sich die Anwesenheit einer aliphatischen Ätherbrücke als einzige O-Funktion (starke Bande bei 9 - 9,1 μ). Das alles macht die Bruttoformel $\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{OH}$ wahrscheinlich.

Die relativ kleine Anzahl H-Atome indiziert die Anwesenheit von 2 Benzolkernen, beide gemäß IR-Spektrum monosubstituiert (13,3 und 14,1 μ). In α -Stellung zu den aromatischen Kernen darf weder eine Methylengruppe stehen (kein Ion 91 im MS) noch ein C-Atom mit Doppelbindung (keine K- und R-Banden im UV). Diese Anforderungen sind erfüllt, wenn beide Kerne am gleichen C-Atom sitzen:

Durch Verbindung der beiden Teilstücke über die Ätherbrücke ergibt sich die Formel für Benzhydramin, bzw. Diphenhydramin:



Zusammenfassend möchten wir bemerken, daß für uns Toxikologen von den instrumentalanalytischen Identifikationsverfahren die Ultraviolett- und Infrarot-Spektroskopie und die Massenspektrometrie die wichtigsten sind. Die erstere kann bereits zur Analyse von relativ rohen Extrakten verwendet werden, während die beiden anderen eine Reinigung durch Kristallisation, Sublimation oder chromatographische Techniken bedingen. In der chemischen Toxikologie werden wir (aus quantitativen Gründen) nur selten die Möglichkeit haben, auch die Kernresonanzspektroskopie einzusetzen. Wir möchten aber darauf hinweisen, daß es in der Praxis durchaus vorteilhaft ist, die neuen instrumentalanalytischen Verfahren mit klassischen Methoden wie Mikro-Elementaranalyse, Schmelzpunktbestimmungen sowie auch mit chromatographischen Trenn- und Anfärbe-Daten zu ergänzen. In der organischen Analytik ist ein instrumentelles Team immer noch das bessere Inventarium als ein Solo-Instrument. Je vielseitiger dieses Team, umso wirkungsvoller sein Einsatz.

V. LITERATUR

1. Kombination instrumenteller Methoden:

- SILVERSTEIN, R.M., BASSLER, G.C.: Spectrometric Identification of Organic Compounds. 3. ed. New York: John Wiley and Sons 1974
- SIMON, W., CLERC, TH.: Strukturaufklärung organischer Verbindungen mit spektroskopischen Methoden. Methoden der Analyse in der Chemie, Band 7. Frankfurt/M.: Akad. Verlagsges. 1967

2. UV-Spektroskopie:

- NEUGEBAUER, F.A.: Absorptionsspektroskopie im sichtbaren und ultravioletten Spektralbereich. In: Gadamer's Lehrbuch der chemischen Toxikologie, Band II, S. 426, Göttingen: Vandenhoeck und Ruprecht, 1966
- SCOTT, A.L.: Interpretation of the Ultraviolet Spectra of Natural Products: Oxford: Pergamon Press, 1964
- SUNSHINE, I., GERBER, S.R.: Spectrophotometric Analysis of Drugs including Atlas of Spectra. Springfield/Ill.: CH.C. Thomas
- CURRY, A.S.: Ultraviolet Spectrophotometry. In: Toxicology, C.P. Stewart and A. Stolmann (Ed.) Bd. I, S. 507 New York; Academic Press, 1960

3. IR-Spektroskopie:

- OTTING, W.: Spektrale Zuordnungstafel der Infrarot-Absorptionsbanden. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer, 1963
- SZYMANSKI, H.A.: Interpreted Infrared Spectra. New York; Plenum Press, 1964
- BELLAMY, L.J.: The Infrared Spectra of Complex Molecules, Methuen and John Wiley and Sons, 1960 Deutsche Übersetzung: W. Brägel, Ultrarot-Spektrum und chemische Konstitution. Darmstadt: Steinkopff-Verlag, 1966
- HUBLEY, CH.E., LEVI, L., EAGLESON, A.D.: Atlas of Infrared Spectra; KBr-Method, In: Toxicology, C.P. Stewart and A. Stolmann, Band I, S. 562 New York: Academic Press, 1960
- OTTING, W.: Infrarot-Spektroskopie. In: Gadamer's Lehrbuch der chemischen Toxikologie, Band II, S. 466, Frankfurt: Akad. Verlagsges., 1967

- SUNSHINE, I., GERBER, S.R.: Spectrophotometric Analysis of Drugs including Atlas of Spectra. Springfield, Ill.; CH.C. Thomas
CLARKE, E.G.C.: Isolation and Identification of Drugs. London: Pharmaceutical Press, 1969

4. *Massenspektroskopie:*

- MC LAFFERTY, F.W.: Interpretation of mass spectra. W.A. Benjamin Inc., 2. Ed., 1973
SEIBL, J.: Massenspektrometrie. Studentexte, Frankfurt: Akad. Verlagsges., 1970
SPITELLER, G.: Massenspektrometrische Strukturanalyse organischer Verbindungen. Weinheim: Verlag Chemie GmbH, 1966
SPITELLER, M., SPITELLER, G.: Massenspektrensammlung von Lösungsmitteln, Verunreinigungen, Säulenbelegmaterial und einfachen aliphatischen Verbindungen. Berlin-Heidelberg-New York: Springer, 1973
FINKLE, B.S., TAYLOR, D.M., BONELLI, E.J.: A GC/MS reference data system for the identification of drugs of abuse. J. chrom. Sci. 10, 312 (1972)
HILL, H.C.: Introduction to Mass Spectrometry. London: Heyden and Son, 1966
SHRADER, S.R.: Introductory Mass Spectrometry. Boston: Allyn and Bacon, 1971
BUDZIKIEWICZ, H.: Massenspektrometrie. Weinheim: Verlag Chemie, 1972

5. *NMR-Spektroskopie:*

- SUHR, H.: Anwendungen der kernmagnetischen Resonanz in der organischen Chemie. Berlin-Heidelberg-New York: Springer, 1965
BIBLE, R.H.: Interpretation of NMR-Spectra, New York: Plenum Press, 1967
BHACCA, N.S., WILLIAMS, D.H.: Applications of NMR-Spectroscopy in organic Chemistry. Holden day Inc., 1964

6. *Kombinationen Chromatographie-Spektroskopie:*

- ETTRE, L.S., MCFADDEN, W.H.: Ancillary Techniques of Gas Chromatography. New York - London: Wiley-Interscience, 1969
LEATHARD, D.A., SHURLOCK, B.C.: Identification Techniques in Gas Chromatography. New York - London: Wiley-Interscience, 1970
MCFADDEN, W.H.: Techniques of combined Gas Chromatography/Mass Spectrometry. New York-London: Wiley-Interscience, 1973
JUVET, R.S., jr., CRAM, S.P.: Gas Chromatography. Analyt. Chem. 46, 101 R (1974)
BRANDENBERGER, H., MÜLLER, S.: Mitt. Lebensmitt. Hyg. 56, 281 (1965)
BRANDENBERGER, H.: Dtsch. Lebensmitt. Rdsch. 70, 31 (1974)

Dr. phil. J. BÄUMLER
Gerichtschemische Laboratorien
CH - 4056 Basel, Pestalozzistr. 22

Prof. H. BRANDENBERGER
Gerichtlich Medizinisches Institut
CH-8032 Zürich