

bringt¹⁸⁵). Der Vorgang ist reversibel, man kann durch Abkühlung die Symptome gleich wieder hervorrufen. Das Eindringen von DDT in den Körper der Schabe ist bei 35 °C beschleunigt. Der prozentuale Abbau der tatsächlich aufgenommenen Wirkstoffmengen ist bei 15° und 25 °C gleich. Die im Warmen gehaltenen Schaben enthalten demnach in ihrem Körperinneren mehr aktiven Wirkstoff als die kalt gehaltenen Tiere. In nicht zu weit vorgeschrittenen Vergiftungsstadien wird die Abbaugröße von DDT durch zwei Faktoren begrenzt. 1.) die im Körper enthaltene DDT-Menge, 2.) das Entgiftungspotential der Schabe. Eine Dosiserhöhung verändert in der Wärme das Entgiftungspotential nicht. In der Kälte wird es aber herabgesetzt, vorausgesetzt, daß mehr als 8 γ DDT in der Schabe enthalten sind. Die geringere Wirksamkeit der Entgiftungsreaktion bei höheren DDT-Mengen in der Kälte ist das Ergebnis einer gesteigerten Wirksamkeit von DDT bei der Zerstörung zahlreicher physiologischer Funktionen in der Zelle¹⁸⁶).

Die letzten Ausführungen haben eindeutig gezeigt, daß ein Stoff, obwohl er die Fähigkeit besitzt, in den Insekten-

¹⁸⁵) E. Haeffiger, Experientia 4, 223 [1948]; J. econ. Entomol. 42, 523 [1950].

¹⁸⁶) E. B. Vinson u. C. W. Kearns, J. econ. Entomol. 45, 484 [1952].

körper einzudringen und lebenswichtige Fermente zu blockieren, noch lange kein brauchbares Insektizid zu sein braucht. Eine wesentliche Rolle spielt hierbei der Stoffwechsel der Insekten, der wirksame Substanzen in unwirksame Produkte verwandeln kann und an sich unwirksame Pharmaka in potente Gifte umzusetzen imstande ist. Die an solchen Umsetzungen beteiligten Reaktionsketten laufen nicht bei allen Insektenarten in der gleichen Weise ab, da enzymatische Umsetzungen in diese Reaktionsketten eingeschaltet sind, die gewisse Fermente voraussetzen, die ihrerseits wieder genetisch bedingt sind. Von hier aus ergeben sich Beziehungen zum Resistenzproblem. Ein Stoff ist auch nur dann als Insektizid brauchbar, wenn er den Bedingungen im Freiland eine genügende Stabilität entgegengesetzt zur Verbürgung einer nachhaltigen Wirkung, wenn er den Stoffwechsel der Pflanze nicht oder nur in erträglichen Grenzen beeinflußt und Menschen sowie Haustieren nicht gefährlich wird. Die notwendig gewordene Beschäftigung mit dem Wirkungsmechanismus von Insektiziden führt zu einer intensiveren Bearbeitung vergleichend biochemischer Probleme, ein Fachgebiet, das bislang nur rein theoretisches Interesse hatte.

Eingeg. am 15. März 1954 [A 584]

Zur Ausscheidung von p-Nitrophenol im Urin nach Einwirkung von Pflanzenschutzmittel „E 605“

Von Dr. SIGRID von EICKEN, Wuppertal-Elberfeld

Aus dem Toxikologischen und Gewerbehygienischen Laboratorium der Farbenfabriken „Bayer“, Wuppertal-Elberfeld

Es wird ein empfindlicher Nachweis von p-Nitrophenol im Urin beschrieben. Man extrahiert das p-Nitrophenol aus der Harnprobe mit organischen Lösungsmitteln, schüttelt es mit wäßrigem Ammoniak aus, reduziert mit $TiCl_3$ und setzt mit o-Kresol zum Indophenolblau um, welches bei $620 \text{ m}\mu$ photometriert wird. Die Bedeutung des Verfahrens für die Diagnose der „E 605“-Vergiftung wird erörtert.

Zur Sicherung der Diagnose und zum Nachweis der Vergiftung mit „E 605“ (0,0-Diäthylthiophosphorsäure-O-p-nitrophenylester) ist bislang zumeist die Prüfung der Cholinesterase-Aktivität herangezogen worden. Rein chemisch analytische Verfahren begegnen gewissen Schwierigkeiten, wenn sie auf Blut und Harn oder Organe angewandt werden sollen. Ein recht charakteristisches Verfahren zum „E 605“-Nachweis ist von Averell und Norris¹) (Reduktion des „E 605“ und diazotieren und kuppeln der entstandenen Amino-Gruppe) angegeben und in der Folgezeit auch von verschiedenen Autoren²⁾ benutzt worden, insbesondere, wenn es sich um die Analyse von Mageninhalt und ähnl. handelt. Die Methode gibt zweifellos zuverlässige Resultate, begegnet jedoch bei der Übertragung auf kleine Mengen Blut, Organe oder Harn recht erheblichen Schwierigkeiten.

Neben dem Verfahren von Averell und Norris sind nun von anderen Autoren Mikro-Bestimmungsmethoden angegeben, die speziell für die Blut-Analyse geeignet sein sollen. Schwedt und Schmidt³⁾ haben ein Verfahren angegeben, bei dem das mit Trichloressigsäure-enteiweißte Blutfiltrat nach Erhitzen mit Alkali eine Gelbfärbung ergeben soll. Wir konnten mit diesem Verfahren keine befriedigenden und hinreichend genauen Resultate und keine ausreichende Empfindlichkeit erzielen. Kaiser und Lang⁴⁾ haben ebenfalls einen Nachweis im Blut angegeben, der sich des Trichloressigsäure-Filtrates bedient. Sie reduzieren mit Zink und

Salzsäure und schließen eine Diazotierung und Kupplung der entstandenen Amino-Verbindung mit Naphthyläthylendiamin, entsprechend dem Verfahren von Averell und Norris, an.

Unsere Versuche haben jedoch gezeigt, daß erstens nur ein geringer Anteil des zum Blut in einer Konzentration von 50–500 γ/ml zugesetzten „E 605“ im Trichloressigsäure-Filtrat erscheint und zweitens ein Nachweis von „E 605“ im Tierversuch nach der hohen Dosis von 20 mg/kg per os im Blut dieser Tiere (Kaninchen) nicht gelingt.

Aus diesen Gründen haben wir uns einer weiteren Möglichkeit des analytischen Nachweises des Kontaktes mit „E 605“ zugewendet, nämlich dem Nachweis des p-Nitrophenols.

Schon 1951 haben Mountain, Zlotolow und O'Conor⁵⁾ darauf hingewiesen, daß im Organismus als Spaltprodukt des „E 605“ p-Nitrophenol auftritt und mit der Indophenolblau-Reaktion im Urin nachweisbar ist. Dasselbe haben auch einige andere Autoren gefunden, die etwas andere Analysenvorschriften veröffentlicht haben. Wir haben diese Methoden überarbeitet und geben im folgenden die Versuchsvorschrift, die sich bei uns bewährt hat:

Als Lösungsmittel zur Extraktion von p-Nitrophenol aus Urin wenden wir wie Lawford und Harvey⁶⁾ eine Mischung von Äther, Petroläther und Isoamylalkohol an. Dem Lösungsmittelgemisch wird das p-Nitrophenol mit 2n Ammoniak entzogen und nach Reduktion mit Titantrichlorid das entstehende p-Aminophenol mit o-Kresol zum Indophenolblau, dessen Absorptionsmaximum bei $620 \text{ m}\mu$ liegt, umgesetzt.

¹⁾ Averell u. Norris, Analytic. Chem. 20, 753 [1948].
²⁾ G. Vogel: Samml. v. Vergiftungsfällen, Arch. Toxikol. 14, 381 [1953].
³⁾ Schwedt u. Schmidt, Dtsch. Med. Wschr. 77, 372 [1952].
⁴⁾ Kaiser u. Lang, Süddeutsch. Apotheker-Ztg. 93, 394 [1953]. Vgl. auch diese Ztschr. 65, 424 [1953].

⁵⁾ Mountain, Zlotolow u. O'Conor, Ind. Health Monthly 77, 88–89 [1951]. ⁶⁾ Lawford u. Harvey, Analyst 78, 63–65 [1953].

Da der größte Teil des p-Nitrophenols wahrscheinlich als Glukuron- und Schwefelsäureester vorliegt, muß zur Bestimmung des gesamten p-Nitrophenols der Urin einer sauren Hydrolyse unterworfen werden.

Reagenzien: Isoamylalkohol (Merck); Petroläther techn. (Kp 40°–60 °C); Äther techn. (destilliert); 15% wäßriges Titantrichlorid (Merck); o-Kresol rein (Merck); p-Nitrophenol (Indicator, Merck); 2n NH₃ (hergestellt aus 25% NH₃ p. a., Merck); konz. HCl, D = 1,19 p. a. (Merck); KOH p. a. (Merck); Bariumchlorid chem. rein (Merck); Oxalsäure rein (Merck); Kaliumpermanganat p. a. (Merck).

Arbeitsvorschrift: 1 cm³ Urin wird nach Verdünnung zu 10 cm³ mit 2 cm³ konz. Salzsäure in einer 50 cm³ Glasstöpselflasche im kochenden Wasserbad 1 h hydrolysiert (es ist notwendig, die Flaschen durch Leukoplaststreifen oder geeignete Klammer fest zu schließen, da sonst die Glasstopfen leicht herausgedrückt werden). Nach dem Abkühlen werden 25 cm³ des Lösungsmittelgemisches (1 proz. Lösung von Isoamylalkohol in einer Mischung von 4 Volumina Petroläther und 1 Volumen Äther) zugesetzt und 10 min in der Schüttelmaschine extrahiert. Nach kurzem Abzentrifugieren pipettiert man 20 cm³ der Lösungsmittelschicht ab und schüttelt sie in einem 100 cm³ Scheidetrichter mit 4 cm³ 2n Ammoniak 2 min aus. Nach 15 min läßt man die wäßrige Schicht in ein Reagenzglas ab, setzt 0,5 cm³ einer wäßrigen o-Kresol-Lösung und 0,5 cm³ einer frisch angesetzten Titantrichlorid-Lösung (3 cm³ einer 15 proz. Titantrichlorid-Lösung werden zu 50 cm³ mit dest. Wasser verdünnt) zu und schüttelt 1 min kräftig bis zum Farbloswerden der Lösung. Nach Abzentrifugieren des Titanhydroxyds bestimmt man nach genau 30 min die Extinktion bei 620 m μ im Pulfrich-Photometer in einer 1-cm-Küvette. Es ist notwendig, die Zeit von 30 min einzuhalten, da nach 35 min die Farbtiefe langsam abnimmt. Ausgewertet wird nach einer Urin-Eichkurve (Bild 1), die den Mittelwert von 3 Meßreihen darstellt. Bei 10 γ beträgt der relative Fehler $\pm 3\%$. Die Extinktion des Urin-Leerwertes schwankt je nach Zusammensetzung des Urins von 0,015 bis 0,04, so daß bei geringerer Konzentration ein größerer Fehler entstehen kann.

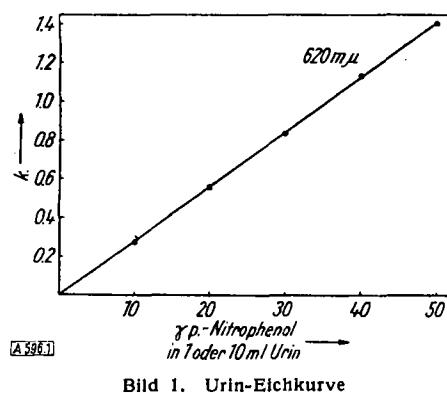


Bild 1. Urin-Eichkurve

Diese Aufarbeitung kann nicht ohne weiteres angewandt werden, wenn 10 cm³ Urin hydrolysiert werden; da je nach Zusammensetzung des Urins von der Eichkurve abweichende Werte erhalten werden. Deshalb wird bei zu erwartenden niedrigen p-Nitrophenol-Konzentrationen nach der Hydrolyse folgende von *Waldman* und *Krause*²⁾ benutzte Reinigungsmethode angewandt:

Der Flascheninhalt wird mit 3,5 cm³ 40 proz. Kalilauge alkalisiert, mit 5 cm³ 25 proz. (Volumprozent) Bariumchlorid-Lösung und mit 3 ml 5 proz. (Vol.-%) Kaliumpermanganat-Lösung versetzt. Man schüttelt und läßt 30 min stehen. Dann wird abzentrifugiert und die überstehende Lösung zu 7 cm³ einer 10 proz. Oxalsäure-Lösung in ein 50 cm³ Zentrifugenglas gegossen. Man schüttelt, bis der Niederschlag sich bildet und zentrifugiert wieder nach 1/2 Stunde. Die überstehende Lösung wird im 100 cm³ Scheidetrichter mit 2 mal 25 cm³ Petroläthergemisch je 2 min extrahiert und nach Ausschütteln der gesammelten Petrolätherauszüge mit 2n NH₃ wird, wie oben beschrieben, weitergearbeitet. Ausgewertet wird ebenfalls nach der angegebenen Eichkurve. Der Leerwert nach dieser Reinigung ist sehr gering, die Extinktion beträgt 0,005 bis 0,01. Die untere Erfassungsgrenze liegt bei 0,025 mg%. Mit dieser Methode gelang es, subtoxische Dosen von „E 605“ durch die p-Nitrophenol-Ausscheidung im Urin einwandfrei zu erkennen.

²⁾ *Waldman u. Krause, Occupational Health 12, 37–38 [1952].*

Anwendungsbeispiele

An drei Kaninchen wurden verschiedene Dosen „E 605“ per os gefüttert. Die Ergebnisse zeigen die Tabellen 1–3.

h	Harn cm ³	p-Nitrophenol γ/cm^3	Gesamt-p-Nitrophenol γ	% d. Dosis
0–8	180	13,5	2430	25,9
8–24	355	8,2	2920	31,1
24–48	280	0,7	196	2,1
48–72	333	ca. 0,2	66,5	ca. 0,7
				59,8

Tabelle 1
Tier 1: 5 mg/kg „E 605“ (insgesamt 20,25 mg)

h	Harn cm ³	p-Nitrophenol γ/cm^3	Gesamt-p-Nitrophenol γ	% d. Dosis
0–8	88	1,6	141	13,4
8–24	245	1,1	270	25,5

Tabelle 2
Tier 2: 1 mg/kg „E 605“ (insgesamt 2,3 mg)

h	Harn cm ³	p-Nitrophenol γ/cm^3	Gesamt-p-Nitrophenol γ	% d. Dosis
0–8	159	0,5	79,5	35
8–24	185	ca. 0,1	18,5	ca. 8,15

Tabelle 3
Tier 3: 0,2 mg/kg „E 605“ (insgesamt 0,49 mg)

In einem Selbstversuch wurden bei einer Dosierung von 0,07 mg/kg „E 605“ per os 70% des Insektizids wiedergefunden. In der Tabelle 4 sind die einzelnen Werte zusammengestellt.

h	Harn cm ³	p-Nitrophenol γ/cm^3	Gesamt-p-Nitrophenol γ	% d. Dosis
0–2	67	5,2	348	19,8
2–5	100	6,1	615	34,9
5–9 ^{1/2}	132	1,7	224	12,8
9 ^{1/2} –22	262	ca. 0,2	52	ca. 3
				70,3

Tabelle 4
0,07 mg/kg „E 605“ per os (insgesamt 3,8 mg)

Eine Cholinesterase-Bestimmung im Blut ergab nach 2 Stunden keine Hemmung.

Diskussion der Ergebnisse

Wie in den zitierten Literatur-Angaben bereits mitgeteilt wurde, fanden auch wir, daß der p-Nitrophenol-Nachweis im Urin außerordentlich empfindlich ist. Man kann daher erwarten, daß man mit diesem Nachweis sehr gut entscheiden kann, ob jemand mit „E 605“ in Kontakt gekommen ist oder nicht. Anderweitige Quellen von p-Nitrophenol im Urin werden sich meist ausscheiden lassen. Bei der Anwendung der Methode auf „E 605“-Vergiftungen muß jedoch besonders darauf hingewiesen werden, daß die quantitativen Verhältnisse zu beachten sind. p-Nitrophenol kann, wie unser obiges Beispiel gezeigt hat, im Harn bereits nachweisbar sein, wenn jemand mit sicher noch nicht toxisch wirkenden „E 605“-Dosen in Berührung gekommen ist. Es wäre also unzulässig, ohne Rücksicht auf die sonstigen Gegebenheiten des Falles den positiven Ausfall unserer Reaktion als Beweis einer Vergiftung anzusehen.

Liegt eine klinische Vergiftung oder ein Verdacht auf eine solche vor, so können zur Sicherung der Diagnose folgende Verfahren herangezogen werden: 1.) Die Bestimmung der Cholinesterase des Serums bzw. der Erythrocyten (defibriniertes Blut), die durch toxische Dosen verschiedener Phosphorsäureester so auch „E 605“ auf unter die Hälfte der Norm gesenkt wird und meist im Verlauf von 14 Tagen zum Ausgangswert zurückkehrt; 2.) Der

direkte Nachweis von „E 605“ nach *Averell* und *Norris* ist nur anwendbar, wenn Mageninhalt (Erbrochenes oder Magenspülung bald nach der Giftaufnahme) oder Reste des aufgenommenen Giftes verfügbar sind; 3.) Unser Nachweis von p-Nitrophenol, der auf eine Harnprobe aus den ersten 24 h nach der Giftaufnahme anzuwenden ist.

Unser Verfahren läßt sich auch auf den Nachweis von p-Nitrophenol im Blut übertragen. Wir hatten jedoch bei darauf gerichteten Versuchen negative Resultate, da offenbar das p-Nitrophenol im Blut auch bei schwerer Vergiftung in zu geringen Mengen (weniger als 0,25 mg%) kreist.

Für den forensischen Nachweis von „E 605“ an der Leiche dürfte unsere Methode in Verbindung mit dem Verfahren von *Averell* und *Norris*, das vermutlich für diese Zwecke die Methode der Wahl bleiben wird, eine gewisse Bedeutung haben. Auffallend ist, daß bei tödlich verlaufenden „E 605“-Vergiftungen die im Harn erscheinenden p-Nitrophenol-Mengen oft gering sind, eine Tatsache, die wahrscheinlich auf einen schnell eingetretenen Tod hindeutet.

Im Tierversuch wurde die Ausscheidung nach Fütterung verschiedener Dosen untersucht. Wie *Gardocky* und *Hazleton*⁸⁾, die „E 605“ drei Hunden intravenös spritzten, fanden wir, daß nach 24 h die Ausscheidung praktisch beendet ist. Die von *Waldman* und *Krause*⁹⁾ an Affen, die subkutan und perkutan „E 605“ erhielten, angegebene sich über 32 Tage hinziehende p-Nitrophenol-Ausscheidung konnten wir bei unseren Versuchen nicht bestätigen. Durch unseren Selbstversuch konnten wir zeigen, daß die von *Jan Lieben*¹⁰⁾ und Mitarbeitern an Schulkindern bei der Ernte von kurz vorher mit „E 605“ gespritztem Tabak beobachtete toxische Grenzkonzentration von 40 γ Nitrophenol pro 100 ml Urin für freies p-Nitrophenol gelten mag, jedoch für unsere Bestimmung des Gesamt-p-Nitrophenols nach vorhergehender Hydrolyse des Harns zu niedrig ist.

Meinem Mitarbeiter A. Gross habe ich für gewissenhafte Analysen zu danken. Eingeg. am 1. Juni 1954 [A 596]

⁸⁾ *Gardocky u. Hazleton*, J. Amer. pharmac. Assoc. sci. Edit. 40, 491 [1951].

⁹⁾ *Waldman u. Krause*, Arch. Ind. Hyg. occupat. Med. 6, 491–495 [1952].

¹⁰⁾ *Jan Lieben*, ebenda 7, 93 [1953].

Über die einheitliche Darstellung der Lichtabsorption von Lösungen im Sichtbaren und Ultravioletten

Von Prof. Dr. M. PESTEMER, Leverkusen und Prof. Dr. G. SCHEIBE, München

Es wird empfohlen, die Absorptionsspektren von Substanzen im Sichtbaren und Ultravioletten einheitlich durch logarithmisches Auftragen des molaren dekadischen Extinktionskoeffizienten ϵ gegen die Wellenzahl $\tilde{\nu}$ darzustellen. Die Umrechnung und Aufzeichnung werden durch Gebrauch eines Rasterpapiers oder einer Rechenschablone und eines Zeichenblattes, die käuflich erhältlich sind, erleichtert.

In den letzten Jahren wird die Messung der Lichtabsorption immer mehr zur Analyse und Konstitutionsbestimmung herangezogen. Leider hat sich noch gar keine Übereinkunft ergeben, wie man die Absorptionskurven am besten einheitlich darstellen soll, so daß durch die willkürliche Mannigfaltigkeit der Vergleich sehr erschwert wird.

Dies hat die Verfasser besonders bei der Bearbeitung der Kurvensammlung für die Neuauflage des „Landolt-Börnstein“¹⁾ zu einer Umzeichnung der Kurven auf einen einheitlichen Maßstab veranlaßt. Die Überlegungen, die zu diesem Maßstab geführt haben, sollen im folgenden kurz wiedergegeben werden, in der Hoffnung, daß diese Art der Wiedergabe allgemein Anklang findet und so eine gewisse Einheitlichkeit in der Literatur erreicht wird.

Es ist zunächst eine Entscheidung über die Charakterisierung der Lichtart durch die Wellenlänge λ (cm, $m\mu$, Å), die Wellenzahl $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) oder die Frequenz ν (sec^{-1}) zu treffen, die durch die Beziehung $\tilde{\nu} = \frac{1}{\lambda} = \frac{\nu}{c_L}$ (c_L = Lichtgeschwindigkeit) miteinander verbunden sind. Es wurde die Wellenzahl $\tilde{\nu}$ gewählt, weil sie in cm^{-1} angemessene Stellenzahlen enthält (4 bis 5 Stellen) und der Energie des absorbierten Lichtes proportional ist. Nur mit einem solchen Maßstab sind gesetzmäßige Zusammenhänge mit der Konstitution zu erwarten. Im besonderen überlagern sich z. B. bei Auftreten von Schwingungsstruktur die Schwingungsterme additiv über einen Elektronen-

anregungsterm, in den Wellenzahlen der Maxima bilden sich daher konstante Abstände aus; während diese bei der Auftragung in Wellenlängen konvergieren. Die Wellenlänge λ ist eine rein konventionelle Größe. Bei den Gitter-Spektralapparaten hat sie den Vorteil, der Dispersion proportional zu sein, weswegen sie wohl auch Eingang in die Meßtechnik gefunden hat. Bei den wesentlich häufiger verwendeten Prismen-Spektralapparaten ist die Dispersionskurve weniger gekrümmt, wenn man Wellenzahlen statt Wellenlängen anwendet. Die Frequenz ν ist unhandlicher als die ihr proportionale Wellenzahl $\tilde{\nu}$, weil der Faktor der Lichtgeschwindigkeit mitgenommen werden muß. Auch ist die Umrechnung der Wellenlänge in die ihr reziproke Wellenzahl einfacher als die Umrechnung auf die Frequenz²⁾. Sollte aus irgendeinem Grunde die Wellenlänge bevorzugt werden, z. B. bei Durchlässigkeitskurven von Filtern, so sollte man im Sinne der leichteren Vergleichbarkeit die kurzen Wellen nach rechts auftragen.

Weiter wurde zugunsten einer logarithmischen, an Stelle einer linearen Darstellung des molaren dekadischen Extinktionskoeffizienten ϵ entschieden. Dieser ist definiert durch das *Lambert-Bouger-Beersche Gesetz*:

$$E = \log \frac{I_0}{I} = \epsilon cd.$$

(I_0 = Intensität des eintretenden, I = Intensität des durchgelassenen Lichtes, c = Konzentration in Mol/l, d = Schichtdicke in cm). Die Extinktion E ist proportional der absorbierten Energie.

¹⁾ *M. Pestemer, G. Scheibe, A. Schöntag u. D. Brück*, „Lichtabsorption von Lösungen im Ultravioletten und Sichtbaren“ in *Landolt-Börnstein*: „Zahlenwerte und Funktionen“, 6. Aufl., 1. Bd., 3. Teil: Molekeln II, herausgeg. von *A. Eucken u. K. H. Hellwege*, Springer, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1951.

²⁾ Tabellen in *H. Staudt*: *Physikalisch-Chemisches Taschenbuch II*, Leipzig 1949 und in *H. Kayser*: *Tabellen der Schwingungszahlen*, Leipzig 1925.