

(Aus dem Institut für gerichtliche Medizin der Universität Wien.
Direktor: Prof. Dr. *Philipp Schneider*.)

Quantitative spektralanalytische Bestimmung von Nitrobenzol in Blut und Organteilen.

Von

Franz X. Mayer,

Assistent und Chemiker.

Mit 1 Textabbildung.

Die Untersuchung von Leichenteilen auf Nitrobenzol setzt sich allgemein aus 2 Teilvorgängen zusammen; aus der Abscheidung dieses Stoffes, aus dem Untersuchungsmaterial mittels einer Wasserdampfdestillation sowie nachfolgendem Ausschütteln des erhaltenen Destillats mit einem für Nitrobenzol geeigneten Lösungsmittel, z. B. Äther, Benzin usw., und aus seinem chemischen Nachweis im Rückstand des zum Ausschütteln verwendeten Lösungsmittels. Der chemische Nachweis beruht nun entweder auf der Reduzierbarkeit des Nitrobenzols zu Anilin, wobei für die quantitative Bestimmung der Überschuß des in gemessenen Mengen zugesetzten Reduktionsmittels bzw. das gebildete Anilin, meist maßanalytisch, festgestellt wird^{1, 11, 12}, oder auf der Bildung von Resorufin und colorimetrischer Auswertung dieser gefärbten Verbindung².

Wie nun aus dem einschlägigen Schrifttum^{3, 6} zu entnehmen ist, besitzt Nitrobenzol im ultraviolethen Strahlengebiet ein für diesen Stoff charakteristisches Absorptionsspektrum, dessen Lage im Koordinatensystem je nach dem verwendeten Lösungsmittel etwas verschieden ist, während seine Form vom angewendeten Lösungsmittel nicht oder nur sehr unbedeutend beeinflußt wird.

Abb. 1 bringt die Absorptionskurve des Nitrobenzols, wobei als Lösungsmittel gereinigtes, d. h. von ungesättigten und aromatischen Kohlenwasserstoffen befreites Normalbenzin der Firma Merck verwendet wurde*. Wie daraus zu entnehmen ist, besitzt die Extinktionskurve des Nitrobenzols ein Maximum bei $\lambda = 2515 \text{ \AA E}$, ein Minimum bei $\lambda = 2210 \text{ \AA E}$ und eine charakteristische Einsenkung zwischen $\lambda = 3000$ und $\lambda = 3200 \text{ \AA E}$ im Steilabfall gegen das langwellige Gebiet.

* Das verwendete Normalbenzin wurde nach dem Verfahren von *Krämer-Böttcher* mit 100proz. Schwefelsäure von den Aromaten und ungesättigten Kohlenwasserstoffen befreit. Ein auf diese Weise gereinigtes Benzin zeigt auch bei den dicksten Schichten bis etwa 2200 \AA E praktisch keine Lichtabsorption. Eine Reinigung mit Nitriersäure ist nicht zu empfehlen, da die gebildeten Nitrokörper nicht restlos aus dem Benzin entfernt werden können, wodurch dieses Benzin oft eine beträchtliche Eigenabsorption besitzt.

Da die Lage dieser Kurve im Koordinatensystem einer Konzentration von 1 g Nitrobenzol in 1 l Normalbenzin entspricht — der Extinktionskoeffizient für eine Konzentration von 1 g/l ist beim Maximum $\lambda = 2515 \text{ \AA}$ $\varepsilon = 79,4$ ($\log \varepsilon = +1,9$) —, läßt sich sofort entnehmen, daß sich noch sehr kleine Mengen Nitrobenzol bis zu etwa 0,05 mg pro 25 cm Lösung quantitativ erfassen lassen, vorausgesetzt, daß keine anderen die Absorption störenden Stoffe vorhanden sind.

Auf Grund dieser Überlegungen habe ich es unternommen, einen Analysengang für die quantitative Bestimmung von Nitrobenzol in Leichteilen unter Zuhilfenahme der Absorptionsspektralanalyse auszuarbeiten, zumal ich bei den seinerzeitigen Untersuchungen über den spektralanalytischen Nachweis von Benzol in Leichteilen⁹ mit dieser Analysenmethode sehr gute Erfolge erzielt habe.

Die Untersuchungen wurden mit einem Quarzspektrographen der Firma Carl Zeiß, Jena, Modell für Chemiker, Plattengröße 9×12 durchgeführt. Als Lichtquelle diente das im UV.-Gebiet sehr linienreiche Emissionsspektrum des kondensierten Wolframfunktens. Zur Festlegung des Verhältnisses I_D/I_0^* wurde das Verfahren mit dem „rotierenden Sektor“ angewendet. Als Photomaterial wurden „Tizian 1500“-Platten der Firma Lainer & Herdliczka, Wien, benutzt, die sich als sehr empfindlich bis weit in das kurzwellige Gebiet hinein erwiesen haben**.

Bezüglich der theoretischen Grundlagen der Absorptionsspektralanalyse sowie der Aufnahmetechnik sei mir gestattet, auf das zahlreiche einschlägige Schrifttum zu verweisen^{4, 5, 7, 8, 10, 13, 14}. Für das Verständnis der für diese Untersuchungen notwendigen Berechnungen sei kurz folgendes erwähnt: Sind die Extinktionskoeffizienten eines Stoffes in zwei Lösungen mit verschiedenem Gehalt bestimmt worden und ist die Konzentration einer der beiden Lösungen an diesem Stoff bekannt, so läßt sich die Konzentration der anderen Lösung nach folgender Formel berechnen:

$$\frac{\varepsilon_1}{\varepsilon} = \frac{c_1}{c}$$

* I_0 = eingestrahlte Lichtmenge, I_D = durchgelassene Lichtmenge.

** Zwecks Erfassung des im entfernteren UV.-Gebiet gelegenen Kurventeiles wurden die Platten durch Bestreichen mit einer dünnen Schichte eines Spindelöles sensibilisiert.

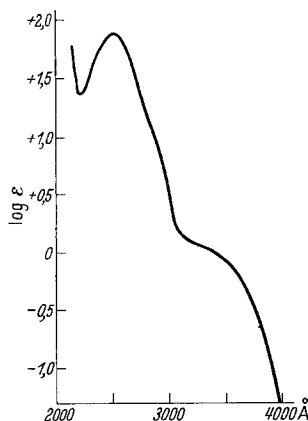


Abb. 1. Nitrobenzol in gereinigtem Normalbenzol. Konz. 1 g/l.

Darin bedeuten ε und ε_1 die Extinktionskoeffizienten und c bzw. c_1 die Konzentrationen. Wie ersichtlich ist, kürzen sich die Dimensionsangaben heraus, so daß für die Konzentrationsangabe jede beliebige Einheit gewählt werden kann. Wird in unserem Falle in obige Formel für ε der Wert 79,4 (d. i. der Extinktionskoeffizient einer Lösung von 1000 mg Nitrobenzol in 1 l gereinigtem Normalbenzin beim Maximum $\lambda = 2515 \text{ \AA E}$) und für c die Konzentration 1000 mg eingesetzt, so ergibt sich folgender Ausdruck für die Berechnung der Konzentration in mg/l Normalbenzin einer Lösung mit unbekanntem Gehalt x an Nitrobenzol,

$$x = \frac{\varepsilon_1 \cdot 1000}{79,4},$$

wobei ε_1 der Extinktionskoeffizient bei $\lambda = 2515 \text{ \AA E}$ der Lösung mit unbekanntem Gehalt ist*. Durch Vorversuche wurde die Gültigkeit des *Lambert-Beerschen* Gesetzes festgestellt.

Das für die Versuche verwendete Nitrobenzol war ein Nitrobenzol der Firma Merck mit bestimmtem Brechungsindex $n_D 20^\circ = 1,552$. Sein spez. Gewicht betrug bei $20^\circ = 1,2035$. Von diesem Nitrobenzol wurden durch Einwiegen in 96 vol.-proz. Alkohol Lösungen mit wohl definierten Gehalten derart hergestellt, daß jeweils immer nur 1 ccm oder weniger einer solchen Lösung in Anwendung gelangte. Durch diese Maßnahme wurde ein auf die Lage der Extinktionskurve im Koordinatensystem störender Einfluß des Alkohols vermieden.

Die Durchführung der Versuche gestaltete sich wie folgt: Zu 50 g gut zerkleinerten, mit 200 ccm destilliertem Wasser zu einem dünnen Brei angerührten Organteilen wie Gehirn, Leber, Nieren usw. bzw. zu 50 ccm Blut wurden in einem geräumigen Rundkolben mit langem Hals jeweils entsprechende Mengen der vorerwähnten alkoholischen Lösungen von Nitrobenzol zugesetzt, so daß der Nitrobenzolgehalt 0,3—50 mg betrug. Der Organbrei bzw. die Blutprobe wurde nun mit 10 ccm Schwefelsäure 1:3 angesäuert und einer Wasserdampfdestillation unterzogen. Das übergegangene Destillat, das mehr oder minder reichliche Mengen mitdestilliertes Fett enthielt, wurde in einem Destillationskolben, der durch fließendes Wasser gut gekühlt wurde, aufgefangen. Die Menge des übergetriebenen Destillates richtete sich nach der zugesetzten Nitrobenzolmenge und schwankte zwischen 50 und 200 ccm. Zwecks Abscheidung des Fettes und anderer die Bestimmung störender Stoffe wurde das erhaltene Destillat mit jeweils so viel fester Kalilauge versetzt, daß die Konzentration an Lauge etwa 5% betrug. Dieses so vorbereitete Destillat wurde nun einer zweiten Wasserdampfdestillation

* Unter Berücksichtigung der tatsächlich verwendeten Menge der Normalbenzinlösung läßt sich aus dem Wert x die wirkliche vorhandene Nitrobenzolmenge berechnen.

unterzogen. Die Menge des nun erhaltenen zweiten Destillats entsprach jeweils dem aus dem Untersuchungsmaterial übergegangenen ersten Destillat. Es wurde in einem Scheidetrichter aufgefangen, der gleichfalls gut gekühlt wurde. Dieses zweite Destillat wurde nun mit kleinen Anteilen an gereinigtem Normalbenzin mehrmals ausgeschüttelt, die vereinigten Normalbenzinauszüge auf ein bestimmtes Volumen gebracht und von diesen Lösungen das Absorptionsspektrum aufgenommen und nach der üblichen Weise ausgewertet. Das Volumen der Normalbenzinauszüge richtete sich naturgemäß gleichfalls nach der Menge des vorhandenen Nitrobenzols.

Tabelle 1. Menge der verwendeten Organteile (Gehirn, Leber, Nieren) 50 g.

Menge jedes der beiden Wasserdampfdestillate in ccm	Menge des Normalbenzinauszuges in ccm	Nitrobenzolmenge in mg		Differenz in mg	Relativer Fehler in %
		zugesezt	gefunden		
200	100	50,0	50,2	+ 0,2	+ 0,4
200	100	10,0	10,0	0,0	0,0
100	50	5,0	4,89	- 0,11	- 2,2
100	25	1,0	0,99	- 0,01	- 1,0
50	25	0,5	0,48	- 0,02	- 4,0
50	25	0,3	0,34	+ 0,04	+ 13,3

Tab. 1 bringt das Ergebnis der Versuche mit Organteilen, während in Tab. 2 die Ergebnisse der Versuche mit Blut zusammengestellt sind.

Tabelle 2. Menge des verwendeten Blutes 50 ccm.

Menge jedes der beiden Wasserdampfdestillate in ccm	Menge des Normalbenzinauszuges in ccm	Nitrobenzolmenge in mg		Differenz in mg	Relativer Fehler in %
		zugesezt	gefunden		
200	100	50,0	49,1	- 0,9	- 1,8
200	100	10,0	10,22	+ 0,22	+ 2,2
100	50	5,0	4,88	- 0,12	- 2,4
100	25	1,0	0,98	- 0,02	- 2,0
50	25	0,5	0,5	0,0	0,0
50	25	0,3	0,31	+ 0,01	+ 3,3

Wie aus beiden Tabellen zu entnehmen ist, lassen sich Nitrobenzolgengen von 50—0,5 mg in 50 g Organteilen bzw. 50 ccm Blut in befriedigender Weise mit Hilfe der Spektralanalyse bestimmen. Sieht man von dem letzten Wert in Tab. 1 ab, so beträgt der relative Fehler im Durchschnitt etwa $\pm 2\%$. Bei den Werten unter 0,5 mg Nitrobenzol pro 50 g bzw. 50 ccm Untersuchungsmaterial machen sich die bei beiden Destillationen aus dem Leichenmaterial übergehenden und durch ein-

fache Maßnahmen nicht entfernbaren Stoffe bereits störend bemerkbar. Diese Stoffe, die in den Normalbenzinauszug mit übergehen und deren Konzentration nicht bestimmbar ist, zeigen eine Absorption, die von etwa $\lambda = 2900 \text{ \AA}$ gegen $\lambda = 2200 \text{ \AA}$ in mehr oder minder gekrümmter Form verläuft. Diese Absorption bewirkt nun bei Nitrobenzolgengen unter 0,5 mg pro 50 g Substanz eine Erhöhung sowie eine Verschiebung des Maximums gegen das entferntere UV.-Gebiet, wodurch naturgemäß eine Bestimmung sehr ungenau, wenn nicht gar unmöglich wird. Sollten so kleine Werte noch erfaßt werden müssen, so muß man eben entsprechend mehr Leichenmaterial verarbeiten.

Es hat sich somit die Anwendung der Absorptionsspektralanalyse als ein sehr geeignetes Verfahren zum Nachweis und zur raschen quantitativen Bestimmung geringer Nitrobenzolgengen in Leichenteilen erwiesen.

Bei einem nach diesem Verfahren untersuchten Fall einer tödlichen Nitrobenzolvergiftung wurden in 100 g Gehirn 29,97 mg Nitrobenzol und in 100 ccm Blut 12,3 mg Nitrobenzol festgestellt.

Zusammenfassung.

Es wird in vorliegender Arbeit die quantitative Bestimmung von Nitrobenzol im Blut und in Organanteilen beschrieben und durch Versuche belegt.

Aus etwa 50 g gut zerkleinerten, mit Wasser zu einem dünnen Brei angerührten Organanteilen bzw. aus 50 ccm Blut wird das Nitrobenzol nach Ansäuern mit verdünnter Schwefelsäure mittels Wasserdampfdestillation ausgetrieben. Das erhaltene Destillat wird zwecks Abscheidung störender Stoffe mit fester Kalilauge versetzt, bis dessen Konzentration etwa 5% beträgt, und einer zweiten Wasserdampfdestillation unterworfen. Das hierbei erhaltene Destillat wird nun mit einem von absorbierenden Kohlenwasserstoffen befreiten Normalbenzin ausgeschüttelt und von dem Normalbenzinauszug das Absorptionsspektrum aufgenommen. Das erhaltene Spektrogramm wird nach der üblichen Weise ausgewertet und aus der Extinktion der erhaltenen Kurve bei $\lambda = 2515 \text{ \AA}$ die Konzentration berechnet. Die Menge der beiden Wasserdampfdestillate bzw. des Normalbenzinauszuges richtet sich nach dem Nitrobenzolgehalt der zu untersuchenden Proben.

Es wird die für die Konzentrationsberechnung notwendige Formel entwickelt.

Mit dieser Methode lassen sich noch 0,5 mg Nitrobenzol in 50 g Organanteilen bzw. 50 ccm Blut einwandfrei bestimmen. Der durchschnittliche relative Fehler beträgt etwa $\pm 2\%$.

Bei einer nach dieser Methode durchgeführten Untersuchung eines tödlichen Falles einer Nitrobenzolvergiftung wurden in 100 g Gehirn 29,97 mg und in 100 ccm Blut 12,3 mg Nitrobenzol gefunden.

Literaturverzeichnis.

¹ *Anding, E. C. jr., B. Zieber u. W. M. Malisoff*, Ind. a. Eng. Chem., Analyt. Ed. Physics **6**, 41 (1934). — ² *Eichler, H.*, Z. anal. Chem. **96**, 21 (1934). — ³ *Ellinger, F.*, Absorptions-Spektroskopie im Ultraviolett. Den Haag 1938. — ⁴ *Fuchs, L.*, Österr. Chem. Ztg **1936**, Nr 6. — Scientia Pharmaceutica, April 1938. — ⁵ *Heilmeyer, L.*, Medizinische Spektrophotometrie. Jena 1933. — ⁶ *Landolt-Börnstein*, Physikalisch-chemische Tabellen. Ergb. 2/2, S. 695 (1931); Ergb. 3/2, S. 1394 (1935). — ⁷ *Löwe, F.*, Optische Messungen. Dresden u. Leipzig 1933. — ⁸ *Luszczak, A., W. med. Wschr.* **1936**, Nr 4, 5, 6. — ⁹ *Mayer, F. X.*, Mikrochemie **24**, 29 (1938). — ¹⁰ *Mohler, H.*, Lösungsspektren. Jena 1937. — ¹¹ *Perrier, M. J.*, u. *M. M. Lobunetz*, Bull. sci. Univ. Etat Kiev. Sér. chim. **2**, 73 (1936) (ukrain.). Ref. C. 1938, II, 3432. — ¹² *Schichutsckaja*, Petrol. Ind. **10**, 75 (1937) (russ.). Ref. C. 1938, II, 469. — ¹³ *Seith, W.*, u. *K. Ruthardt*, Chemische Spektralanalyse. Berlin 1938. — ¹⁴ *Weigert, F.*, Optische Methoden der Chemie. Leipzig 1927.

Schlußbericht zu meiner früheren Arbeit:

Über spektrographische Untersuchungen von Alkaloiden in Leichenteilen.

Von

Dr. Struck, Breslau.

Im vergangenen Jahre habe ich in Bonn über den Einfluß der Fäulnis auf den spektrographischen Absorptionsnachweis von Alkaloiden in Leichenteilen berichtet. Ich konnte damals nur die Anfänge der Untersuchungen berücksichtigen; nunmehr sind die Versuche abgeschlossen.

Um den Einfluß der Fäulnis auf den Absorptionsnachweis der Alkaloide zu untersuchen, wurden jeweils 400 mg Alkaloid mit 250 g Leichenteilen vermischt, der Fäulnis überlassen und nach bestimmten Zeiten dem Stas-Otto-Trennungsgang unterworfen. Der letzte Extrakt dieses Trennungsganges wurde dann auf seine Absorptionseigenschaften im Ultraviolett untersucht. Die Einzelheiten der Methode muß ich als bekannt voraussetzen, die Untersuchungsergebnisse wurden gleich in Form der ermittelten Extinktionskurven beim Vortrage gezeigt. Es handelte sich um Extinktionskurven von ausgemittelten Chinin, Cocain, Strychnin, Morphin und Veratrin; die Fäulniszeit betrug bis zu 250 Tagen.

In den ersten beiden Abbildungen wurden die Extinktionskurven so dargestellt, wie sie aus den Versuchen direkt hervorgingen. Dabei überschneiden sich einzelne Kurven. Da die Erkennung des Alkaloids aber lediglich von der Kurvenform abhängig ist, wurden in den nächsten Abbildungen die Extinktionskurven *übereinander* dargestellt, so daß die Veränderung ihrer Form besser zu erkennen ist. Je stärker der Fäulnisgrad des Untersuchungsmaterials war, desto stärker ist die reine Alkaloidkurve verzerrt. Die Kurven bestätigen die auf rein chemischem