

## Übersichtsreferat—Review Article

# Grenzen der Nachweismöglichkeiten von Substanzen in Körperflüssigkeiten und -geweben

GOTTFRIED MACHATA

Institut für gerichtliche Medizin der Universität Wien (Österreich)

Eingegangen am 24. Oktober 1971

### *The Detection Limits of Substances in Biological Liquids and Tissues*

*Summary.* The detection limits of toxicologically important substances depend on the matrix of the material to be analyzed and on the preparation of the sample. The preparation serves to concentrate the traces to lower the detection limit as far as possible. Most emphasis in toxicological work is to be laid on the amount of material required for the analyses.

By using modern physico-chemical apparatus extremely low detection limits can be achieved although many difficulties have still to be overcome in the preparation of the samples. This preparation is very laborious and tedious compared with the actual measurements and may cause considerable loss of substance.

*Zusammenfassung.* Die Grenzen der Nachweismöglichkeiten toxikologisch interessanter Substanzen, seien es flüchtige, organische oder metallische Gifte, hängen von zwei verschiedenen Gegebenheiten ab. In erster Linie ist durch die analytische Methode eine bestimmte Nachweisgrenze in einer Matrix festgelegt, und zweitens kann ein Aufschlußverfahren, das ein Untersuchungsmaterial zur Analyse vorbereitet und unter Umständen diese erst ermöglicht, eine Anreicherung bewirken, die eine niedrigere Nachweiskonzentration zu ermitteln gestattet. Wesentlich jedoch ist die Menge des Untersuchungsmaterials, das aufgearbeitet werden muß, um in die Nähe dieser Konzentration zu gelangen. In vielen Fällen bewirkt eine bestimmte vorhandene Menge eine Grenze der Anreicherung und damit der Nachweisbarkeit. Bei Angaben über die Grenzen der Nachweisbarkeit ist also neben der Größe der Grenzkonzentration in einer bestimmten Matrix auch der benötigte Probeneinsatz anzuführen.

Moderne physikalisch-chemische Analysengeräte gestatten es ohne weiteres, kleinste Nachweisbereiche zu erreichen; die Schwierigkeiten liegen heute ausschließlich in der Probenvorbereitung, die im Vergleich zu dem eigentlichen Analysenverfahren als aufwendig, langwierig und unter Umständen als verlustreich anzusehen ist.

*Key words:* Analytik, instrumentelle — Biologisches Material, toxikologische Untersuchung — Nachweisgrenzen, toxikologische Substanzen — Toxikologie, Nachweismöglichkeiten.

Die Grenzen der Nachweismöglichkeiten toxikologisch interessanter Substanzen, seien es flüchtige, organische oder metallische Gifte, hängen von zwei verschiedenen Gegebenheiten ab. In erster Linie ist durch die analytische Methode eine bestimmte Nachweisgrenze in einer Matrix festgelegt, und zweitens kann ein Aufschlußverfahren, das ein Untersuchungsmaterial zur Analyse vorbereitet und unter Umständen diese erst ermöglicht, eine Anreicherung bewirken, die eine niedrigere Nachweiskonzentration zu ermitteln gestattet. Wesentlich jedoch ist die

Menge des Untersuchungsmaterials, das aufgearbeitet werden muß, um in die Nähe dieser Konzentration zu gelangen. Wenn man eine analytische Aufgabe in Teilschritte zerlegt, ergeben sich folgende Positionen:

Probennahme  
 Probenvorbereitung  
 Aufarbeitung  
 (Anreicherung)  
 Messung  
 Berechnung  
 Beurteilung

In vielen Fällen bewirkt eine bestimmte vorhandene Menge eine Grenze der Anreicherung und damit der Nachweisbarkeit. Bei Angaben über die Grenzen der Nachweisbarkeit ist also neben der Größe der Grenzkonzentration in einer bestimmten Matrix auch der benötigte Probeneinsatz anzuführen (Kaiser [6]). An einigen Beispielen sei dies deutlich gemacht (Tabelle 1).

Für die naß-chemische Analyse von Metallspuren benötigt man mindestens 100 g Organmaterial und erreicht eine Nachweisgrenze von Milligrammen (Machata u. Neuninger [7, 9]). Nach entsprechendem Aufschlußverfahren können mittels Colorimetrie noch Zehntel bis Hundertstel Milligramm nachgewiesen werden. Polarographische und RFA-Methoden benötigen bei gleicher Nachweisempfindlichkeit einen Probeneinsatz von etwa 10 g, bei Emissions- und AA-Untersuchungen schließlich wird nur 1 g Untersuchungsmaterial benötigt, wobei Mikrogramme nachgewiesen werden können. Neue Möglichkeiten eröffnen sich bei der AA mit Graphitrohrküvette. Die Probenmenge kann auf 10 bis 50 mg herabgesetzt werden, die Nachweisempfindlichkeit beträgt etwa  $10^{-10}$  g absolut. Das Ge-

Tabelle 1

Nasse Chemie	100 g Probe	$10^0$ — $10^{-1}$ mg
Colorimetrie		$10^{-1}$ — $10^{-2}$ mg
Polarographie	10 g Probe	$10^{-2}$ mg
RFA		$10^{-2}$ mg
EM	1 g Probe	$10^{-3}$ mg
AA		$10^{-3}$ mg
AA-HGA	0,1 g Probe	$10^{-6}$ — $10^{-8}$ mg
GC	100 g Probe	$10^{-3}$ mg
GC (Dampfraum)	1 g Probe	$10^{-3}$ mg
DC	10 g Probe	$10^{-3}$ mg
UV	10 g Probe	$10^{-2}$ mg
IR		$10^{-2}$ mg

sage macht nochmals nachdrücklich klar, daß eine hohe Nachweisempfindlichkeit noch wenig nützt, wenn nicht gleichzeitig diese Empfindlichkeit mit einem geringen Probenmaterial und damit auch mit geringem Arbeitsaufwand zu erzielen ist. Bei diesen Betrachtungen sind jedoch grundsätzliche Einschränkungen zu

machen, die insbesondere für die forensische Praxis gelten. Diese Einschränkungen müssen insbesondere wegen der Inhomogenität des Untersuchungsmaterials und damit wegen der Richtigkeit des Ergebnisses gemacht werden. Es ist sinnlos, aus 1 g Leber die Barbituratkonzentration zu bestimmen, wenn nicht zumindest Teile oder die ganze Leber zuerst homogenisiert wurde, außer man will etwas über die Verteilung in der Leber erfahren (Weinig [12]). Darum gehen wir z. B. bei der GC-Alkoholbestimmung von 0,5 ml Blut nicht ab, obwohl z. B. für die skandinavischen Länder eine Spezialvorschrift mit 0,1 ml Blut entwickelt wurde. In der analytischen Chemie wird nicht umsonst auf die korrekte Probenziehung größter Wert gelegt; diese Tatsache sollte uns in Erinnerung bleiben (Machata [8]).

Die zweite Einschränkung hat als Ursache die unbedingt nötige Aufarbeitung der Proben vor der eigentlichen Analyse, sei es durch nasse oder trockene Veraschung, Extraktion, chromatographische Reinigungsverfahren u. a. Wegen dieser Operationen wird man zwangsläufig bei Probenmengen bleiben müssen, die ein einfaches und möglichst wirksames Arbeiten gestatten. Als optimal haben sich Mengen von 0,5 bis etwa 100 g herausgestellt.

Bei temperaturempfindlichen Metallen empfiehlt sich seit jeher die nasse Veraschung. Die Mängel dieser Methode sind bekannt: großer Zeitbedarf, kompletter Aufschluß schwierig (Perchlorate explosiv), Einschleppungsgefahr von Begleitstoffen. Die trockene Veraschung ist hingegen relativ problemlos, aber gerade für die Giftmetalle, wie Blei, Arsen, Quecksilber, Thallium und Zink, nicht oder nur mit besonderer Vorsicht anzuwenden. Als Methode der Wahl kann die Niedrig-Temperatur-Veraschung angesehen werden, die eine vollkommene Zerstörung des organischen Materials bei maximal 150° im Sauerstoffstrom und in einem hochfrequenten Feld ausführt (Gleit u. Holland [4]). Biologische Proben werden zuerst gefriergetrocknet und über Nacht verascht. Die Asche ist vollständig in verdünnten Säuren löslich und kann direkt mit physikalisch-chemischen Methoden untersucht werden. Der Anreicherungsseffekt beträgt etwa 10–100 und genügt in den meisten Fällen für einen direkten Nachweis. Sind die nachzuweisenden Mengen der Elemente so groß, daß sie mittels RFA direkt erfaßt werden könnten, kann das gefriergetrocknete Material, z. B. Harn oder Blut, nach Verpressung direkt untersucht werden. Für die meisten toxikologisch-chemischen Untersuchungen ist diese Technik ausreichend und erlaubt ein rasches Arbeiten (Hauck [5]; Neuninger u. Machata [9]). Bei allen Materialien, die neben den zu suchenden Spuren große Mengen anderer Elemente enthalten, müssen jedoch Matrixeffekte beachtet werden. Dies gilt insbesondere für die spektroskopischen Verfahren, wie Emission, Flammenphotometrie, AA und auch RFA. Bedeutende Fehler werden gemacht, wenn dies nicht berücksichtigt wird bzw. wenn eine unkorrekte Matrix als Vergleich gewählt wird. Selbst bei der GC-Dampfphraumanalyse des Blutalkohols ist ein solcher Effekt vorhanden, und wir sind dazu übergegangen, dies zu berücksichtigen. Es ist sehr leicht möglich, die absolute Höhe des inneren Standards als Maß für den Dampfdruck heranzuziehen. Korreliert man diesen Wert mit dem Zustand der Probe (Floating-Faktor: Blut, Serum, blutiges Serum, Harn, Tests), so kann die Berechnung mit höchster Präzision vorgenommen werden. Eine EDV besorgt die Berechnung und bedarf dann keiner besonderen Programmierung, um den Probenzustand zu kennzeichnen (Battista u. Machata [1]). Gleichzeitig ist zum Beispiel auch der Wassergehalt des Blutes, der besonders bei Leichen einer eigenen Berech-

nung bedarf (Brettel [2a]), berücksichtigt, und die automatische Korrektur ergibt den entsprechenden Alkoholwert, bezogen auf den normalen Wassergehalt.

Fast ohne Einfluß der Matrix ist z. B. die Polarographie, die GC mit direkter Einspritzung, DC und unter Umständen die Colorimetrie, jedoch sind entsprechende Aufarbeitungsvorgänge (Aufschluß, Extraktion) nicht zu umgehen.

Die Zeit der Eprouvetten-Chemie ist — wie man unschwer erkennen kann — vorbei. Um jedoch die modernen Methoden in ihrem Wert zu erfassen, anzuwenden und zu beurteilen, muß sie noch immer beherrscht werden. Nach sorgfältigster Prüfung und Auswahl der zweckentsprechendsten Aufarbeitung und einer geeigneten Analysenmethode nach den gegebenen Möglichkeiten — schnell, spezifisch, genau und hoher Informationswert — erhält man schließlich das Ergebnis in Form einer Zahl. Die Richtigkeit dieser Zahl zu prüfen ist nicht immer leicht und gelingt um so besser, je mehr Analysen durchzuführen sind. Aus diesem Grund sind sorgfältig ausgearbeitete Standardmethoden und vorhandene Standardproben von unschätzbarem Wert. Es ist aber auch der relativ falsche Wert — immer gleichartig gewonnen — für den Untersucher eine Hilfe und eine bestimmte Information. Eine andere angewandte Methode bzw. Untersuchungstechnik bzw. ein Wert aus einem anderen Labor oder aus der Literatur würde keinerlei Vergleich gestatten und ist oft der Grund für differierende Ansichten über ein bestimmtes Problem (Schmidt [10], Weinig [11]).

Es sei in diesem Zusammenhang nochmals betont, daß zum Beispiel bei einer Barbituratbestimmung eines bestimmten Falles völlig gleichgültig sein kann, ob der Gehalt 3,0 oder 3,5 mg% beträgt, da unter Umständen mit einem Aufarbeitungsverlust von 20—30% gerechnet werden muß. Das Ergebnis sollte mit größter Akribie erzielt, aber über die Fehlergröße kein Zweifel gelassen werden. Die angegebene Zahl allein sagt aber trotz vieler Dezimalstellen noch nichts über die Richtigkeit des Wertes aus, und kein Ausspruch trifft hier besser zu als der von Gauss: „Der Mangel an mathematischer Bildung gibt sich durch nichts so auffallend zu erkennen, wie durch maßlose Schärfe im Zahlenrechnen“ (Gauss [3]).

Wenn nun über Nachweisgrenzen, Genauigkeit und Richtigkeit von Analysen gesprochen wird, soll vielleicht erwähnt werden, daß auch die Bedeutung und der Sinn der Spurenanalyse jeweils abgeschätzt werden müßte. Wenn zum Beispiel ein Kupfernachweis im Harn zu führen ist, so wird es maximal genügen, ein Verfahren anzuwenden, das eine Nachweisgrenze zu erzielen gestattet, die im physiologischen Bereich liegt. Für eine toxikologische Untersuchung wäre die Nachweisgrenze noch geringer anzusetzen. Und nur ein Wert, der signifikant über dem Bereich des Normalwertbandes liegt, könnte Anspruch auf Bewertung in chemisch-forensischer Hinsicht erheben.

Für die Aufarbeitung von biologischem Material zur Untersuchung auf organische Gifte gibt es prinzipiell drei bewährte Techniken:

1. Direkte Extraktion.
2. Fällung mit organischen Lösungsmitteln (Aceton, Alkohol).
3. Fällung mit Enteiweißungsmitteln, wie Wolframat oder Trichloressigsäure.

Sorgfältig durchgeführt, sind diese Methoden sicher gleichwertig nebeneinander zu stellen. Man wird jeweils von Fall zu Fall entscheiden müssen, welchem Verfahren der Vorzug zu geben ist. Fest steht, daß eine nachfolgende Lösungs-

mittelextraktion rationell nur mit einem kontinuierlich arbeitenden Apparat durchzuführen ist, der auch die maximale Ausbeute garantiert. Das eigentliche Verfahren zum Nachweis schließlich sollte nach Möglichkeit nur wenige Operationen beinhalten, um mögliche Verluste zu vermeiden. Die eingangs angeführten Nachweisgrenzen organischer Substanzen reichen für die forensische Chemie ohne weiteres aus, geben jedoch gerade in diesem Spurenbereich die größten Schwierigkeiten mit der Identifikation. Diese Schwierigkeiten, bedingt durch die Vielzahl der modernen Pharmaka, sind bis jetzt noch nicht überwunden und nur mittels kostspieliger Geräte, wie GC kombiniert mit MS und verbunden mit EDV, zu bewältigen. Solche Großanlagen können jedoch nicht im Rahmen eines Routine-Laborbetriebes eingesetzt werden, sondern erfordern eigene Räume und Personal. Dazu noch einige Bemerkungen:

Die instrumentelle Analytik ist im schnellen Fortschritt begriffen. Neben bewährten Verfahren kommen immer mehr neue Methoden und neue Apparate zur Anwendung, die unter Umständen neue Grenzbereiche und Möglichkeiten erschließen. Der Vorteil dieser Methoden ist enorm, wobei vielleicht an erster Stelle der erhöhte Informationswert steht (Brandenberger [2]).

Der größere Durchsatz an Proben, die Vereinfachung der Bedienung und der Fachkräftemangel bedingen eine weitgehende Automatisierung, die aber wieder zum größeren Entwicklungsaufwand und zur längeren, sorgfältigeren Einschulung von Fachkräften führt. Es ist sinnlos zu glauben, daß eine automatisierte Anlage die Arbeit wesentlich erleichtert; der Durchsatz steigt zwar erheblich, der Bedienungs- und Wartungsaufwand, der zur Wartung nach allfälliger Fehlerbehebung nötig ist, jedoch ebenso. Dieses Dilemma erscheint unüberwindlich, und ein Ausweg ist nicht in Sicht. Dem fast unbedingten „*Muß*“ der Einführung von neuen analytischen Verfahren hat immer eine sorgfältige Prüfung voranzugehen, ob diese Verfahren auch Zeitersparnis und die Rationalisierung bringen. Um die Auslastung wird man sich in den wenigsten Fällen kümmern müssen, denn spätestens nach 1 Jahr sind die Anforderungen größer als der mögliche Durchsatz.

Moderne physikalisch-chemische Analysengeräte gestatten es ohne weiteres, kleinste Nachweisbereiche zu erreichen. Die Schwierigkeiten liegen heute ausschließlich in der Probenvorbereitung, die im Vergleich zu dem eigentlichen Analysenverfahren in den meisten Fällen als aufwendig, langwierig und unter Umständen auch als verlustreich anzusehen ist. Dazu kommt noch, daß die Regeln der Spurenanalyse peinlich genau befolgt werden müssen, um Artefakte zu vermeiden, und die erhaltenen Werte kritisch beurteilt werden müssen.

Die Auswahl entsprechender Methoden und auch die Deutung der Befunde bleibt aber immer dem Untersucher überlassen, der die Beweiskraft seiner Werte kennt und auch die Verantwortung für die Einführung neuer Verfahren in den Routinebetrieb trägt.

Für die großzügige Förderung der Forschungsvorhaben sei dem Fonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung an dieser Stelle herzlichst gedankt.

### Literatur

1. Battista, H.-J., Machata, G.: Unveröffentlicht.
2. Brandenberger, H.: Methodische Entwicklung in der chemischen Toxikologie. Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med. **57**, 300 (1966).

- 2a. Brettel, H.-F.: Erfahrungen mit Wassergehaltsbestimmungen bei Leichenblut. Blutalkohol **6**, 439 (1969).
3. Gauß, C. F.: Zit. aus F. W. Küster: Logarithmische Rechentafeln, 74.—83. Aufl. Berlin: de Gruyter 1958.
4. Gleit, Ch. E., Holland, W. D.: Use of electrically excited oxygen for the low temperature decomposition of organic substances. Anal. Chem. **34**, 1454 (1962).
5. Hauck, G.: Bestimmung toxikologisch wichtiger Elemente in biologischem Material mittels Röntgenfluoreszenz-Analyse. Z. Anal. Chem. **243**, 98 (1968).
6. Kaiser, H.: Zum Problem der Nachweisgrenze. Z. Anal. Chem. **209**, 1 (1965).
7. Machata, G., Neuninger, H.: Schnellverfahren zur Ermittlung von Metallgiften. Arch. Toxikol. **17**, 41 (1958).
8. Machata, G.: Über die gaschromatographische Blutalkoholbestimmung, II. Mitt. Blutalkohol **7**, 345 (1970).
9. Neuninger, H., Machata, G.: Der Nachweis von Metallgiften. Beitr. gerichtl. Med. **26**, 235 (1969).
10. Schmidt, Gg.: Der forensische Beweiswert toxikologischer Untersuchungen. Beitr. gerichtl. Med. **25**, 122 (1969).
11. Weinig, E.: Probleme der forensischen Toxikologie. Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med. **56**, 125 (1965).
12. Weinig, E., Hauth, E., Kunzmann, G.: Über die postmortale Veränderung der Verteilung von Thallium und Blei in der Leber. Beitr. gerichtl. Med. **23**, 280 (1965).

Prof. Dr. Gottfried Machata  
Institut für gerichtliche Medizin  
der Universität  
A-1090 Wien, Sensengasse 2  
Österreich