

Aus dem Institut für gerichtliche Medizin und Kriminalistik (Prof. Dr. E. FRITZ)
und dem Physiologisch-Chemischen Institut (Prof. Dr. J. KÜHNAU)
der Universität Hamburg.

Erprobung einer spezifischen Fermentmethode zur Mikrobestimmung von Äthylalkohol.

Von

G. DOTZAUER, H. REDETZKI, K. JOHANNISMEIER und Th. BÜCHER.

Mit 4 Textabbildungen.

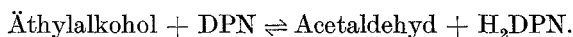
Übersicht.

Ein wesentlicher Nachteil der zur Zeit in der forensischen Analyse eingeführten Bestimmungsmethoden für Äthylalkohol liegt in ihrer Unspezifität. Obwohl eine Reihe von Autoren die Fehlermöglichkeiten bei den Reduktions- wie auch interferometrischen Methoden abgegrenzt haben, und man das Ausmaß des störenden Einflusses exogener und endogener Faktoren im großen und ganzen kennt, ergeben sich in der gerichtlichen Verwertung immer wieder Angriffspunkte, welche den Wert der Analyse schmälern. Es liegt daher nahe, spezifische Methoden für die forensische Bestimmung von Äthylalkohol zu suchen, welche die bisher üblichen ersetzen können oder zumindest in Streitfällen eine methodisch unabhängige Kontrolle ermöglichen. Wir haben es deshalb unternommen, eine spezifische photometrische Methode zur Bestimmung von Äthylalkohol, welche von BÜCHER und REDETZKI¹ kürzlich entwickelt worden ist*, im Hinblick auf den forensischen und wissenschaftlichen Bedarf zu erproben.

Die neue Bestimmung ist aus den von OTTO WARBURG geschaffenen photometrischen Methoden zur Testung von Stoffwechselfermenten entwickelt worden. Bei diesen, von ihrem Entdecker sogenannten „optischen“ Testen^{2,3} finden Reaktionen der Substrate statt, welche von einer Anfärbung (im langwelligen Ultraviolett) des Reaktionssystems begleitet sind, und die sich mit der üblichen photometrischen Methodik einfach und quantitativ verfolgen lassen. Zur Bestimmung von Äthylalkohol kann man sich nach diesem Prinzip die Spezifität eines hochgereinigten

* *Anmerkung bei der Korrektur.* Wie wir erst nach Absendung des Manuskripts erfahren haben, ist von R. K. BONNICHSEN und H. THEORELL (Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation **3**, 58 (1951) eine Fermentmethode zur forensischen Bestimmung von Äthylalkohol entwickelt worden, die sich ebenfalls des „optischen Testes“ bedient. Die Methode dieser Autoren unterscheidet sich von der hier beschriebenen prinzipiell durch folgende Einzelheiten: 1. Destillation der Blutprobe, 2. Verwendung kristallisierter Alkoholdehydrase aus Pferdeleber, 3. Messung der Reaktionskinetik an Stelle des Endwertes.

kristallisierten Stoffwechselferments, der Alkoholdehydrase⁴, eines der Schlüsselenzyme der alkoholischen Gärung, zunutze machen^{5, 6}. Dieses Ferment katalysiert eine wasserstoffübertragende Reaktion, bei der Äthylalkohol in Acetaldehyd überführt und gleichzeitig die Substanz DPN hydriert wird (DPN = Diphosphopyridinnucleotid⁷, das von OTTO WARBURG entdeckte Co-Ferment der Wasserstoffübertragungen im Zellstoffwechsel):



Die hydrierte Form des spezifischen Acceptors DPN ist durch eine starke Lichtabsorption ausgezeichnet. Damit ist die Grundlage einer photometrischen Bestimmungsmethode gegeben, bei der dem Ferment die Rolle der Selektivität zufällt, während der Acceptor eine einfache quantitative Verfolgung der Reaktion ermöglicht. Wir beschreiben im folgenden:

1. Technische Einzelheiten der neuen Methode.
2. Untersuchungen über deren Anfälligkeit gegen störende Faktoren.
3. Vergleichende Alkoholbestimmungen mit der Mikrodestillation nach WIDMARK^{8, 9} und der Fermentmethode an einem größeren Material experimenteller Alkoholbelastungen und schließen eine Diskussion der Ergebnisse an.

Fermentmethode.

Vorbemerkungen.

Die Reaktion, mit der wir Äthylalkohol bestimmen, ist umkehrbar. Wenn man keinen Kunstgriff anwendet, liegt der Schwerpunkt des Gleichgewichtes ungünstig, da kinetisch die Hydrierung von Acetaldehyd (die physiologische Richtung der Fermentreaktion) begünstigt ist. Die Mittel, mit denen man trotzdem die völlige Umsetzung auch sehr kleiner Alkoholmengen in praktisch annehmbaren Reaktionszeiten erzwingen kann, sind: alkalisches Reaktionsmilieu⁶, Einsatz relativ großer Fermentmengen und Zusatz eines Aldehydfängers. Für den letzteren Zweck hat sich Semicarbacid, welches schon von NEGELEIN und WULFF⁴ bei der Isolierung der Alkoholdehydrase verwendet wurde, am besten bewährt. Die unter diesem Gesichtspunkt von uns gewählte Zusammensetzung der Reaktionslösung zeigt Tabelle 1.

Alkoholdehydrase haben wir nach den Vorschriften von NEGELEIN und WULFF⁴, sowie von RACKER⁶ aus Lipman-Hefe (langsam getrocknete Bäckerhefe) dargestellt. Besondere Aufmerksamkeit mußte auf die Reinigung des eingesetzten Fermentes verwandt werden, da bei dem relativ hohen Einsatz von Ferment in der Äthylalkoholbestimmung Spuren anderer Dehydrasen die Spezifität stören könnten. Wir haben die Präparate mehrmals umkristallisiert und getestet. Sie enthielten 800—1000 Fermenteinheiten im Milligramm Protein (Testvorschrift in

der Anlage zu dieser Arbeit). Wie Abb. 1 zeigt, schließt die in der Vorschrift angegebene Menge eines solchen Präparates bei einer Reaktionszeit von 70 min etwa die doppelte Sicherheit ein.

DPN wurde nach der geringfügig modifizierten Vorschrift von WILLIAMSON und GREEN¹¹ zubereitet. Zur Senkung des Blindwertes wurden die Präparate bei 60°C im Hochvakuum getrocknet und ihre Lösungen vor dem Gebrauch mit 10% des Volumens 50% iger Aluminiumhydroxyd-Suspension digeriert und abzentrifugiert (Testvorschrift in der Anlage).

Die käuflichen Semicarbacidqualitäten enthalten Spuren von Äthylalkohol, welche durch Umkristallisation in Wasser oder Auskochen in Benzol entfernt werden können. Die Extinktion der Alkoholreaktion messen wir bei der Wellenlänge 366 m μ . Das Maximum der Absorptionsbande des hydrierten DPN liegt bei 340 m μ ¹²; es hat sich jedoch als zweckmäßig erwiesen, die Quecksilberlinie 366, die stärkste und mit Glasfiltern am einfachsten isolierbare Spektrallinie der Quecksilberdampfampe, zu verwenden. Strahlung dieser Wellenlänge durchdringt, obwohl sie nicht mehr sichtbar ist, noch Glascuvetten und dünnere Glaslinsen, so daß die Fermentmethode bei Verwendung einer Quecksilberlampe als Lichtquelle in jedem photometrischen Colorimeter durchführbar ist. Wir verwenden das Photometer „Eppendorf“, bei dem die Ablesungen in direkter Anzeige in kürzester Zeit getätigt werden können*.

Die Bestimmung von Alkohol kann an sich im normalen Serum ohne weitere Vorbereitung durchgeführt werden. Im Verlauf dieser Arbeit sind eine Reihe dergestalt erhaltener Meßreihen durchgeführt worden, welche gute Ergebnisse gezeigt haben. Da jedoch hämolytische Sera Blindwerte ergeben, die zusätzlich bestimmt und subtrahiert werden müssen, und es zudem wünschenswert war, die Bestimmungen auch

Tabelle 1. *Reaktionslösung.* (Substanzen in mg/ml angegeben.)

| | |
|---|------|
| Semicarbacidhydrochlorid | 8,0 |
| Na ₄ P ₂ O ₇ · 10 H ₂ O | 32,0 |
| Na-hydroxyd | 2,5 |
| Glykokoll | 1,6 |
| DPN (berechnet als reine Substanz) | 0,26 |
| Alkoholdehydrase | 0,1 |
| p _H = 8,5 | |

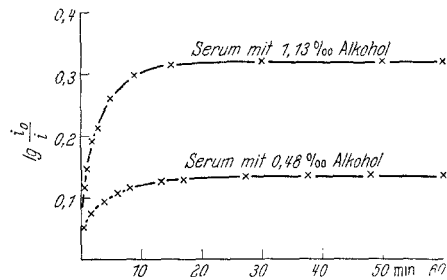


Abb. 1. Reaktionskinetik der Fermentmethode. Ordinate: Zuwachs der Extinktion über den Blindwert (0,040) bei 366 m μ . Abszisse: Zeit in Minuten.

* Elektromedizinische Werkstätten „Medeor“, Hamburg 20.

an Vollblut durchzuführen, enteiweißten wir durchweg die Analysenproben vor der Bestimmung mit Perchlorsäure¹³, einer Substanz, welche im schwach alkalischen Milieu keinerlei störende Einflüsse auf die Fermentreaktion ausübt.

Arbeitsvorschrift.

Lösung I. 10 g Natriumpyrophosphat (10 H₂O), 2,5 g Semicarbidhydrochlorid, 0,5 g Glykokoll werden in der Reihenfolge in Wasser gelöst, mit 10 ml 2 n NaOH versetzt und auf 300 ml aufgefüllt.

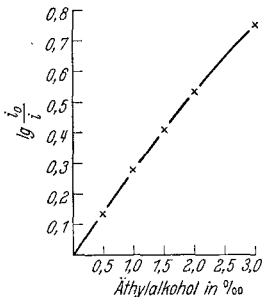


Abb. 2. Eichkurve der Fermentmethode. Meßinstrument: Photometer Eppendorf; Meßstrahlung: 366 m μ ; Schichtdicke 1 cm.

Lösung II. DPN in Wasser entsprechend einem Gehalt von 13 mg 100%igem DPN/ml*. Beide Lösungen halten sich im Eisschrank 2 Wochen*.

Lösung III. 45,5 g Ammonsulfat und 3 g Natriumpyrophosphat (10 H₂O) p. a. Merck in 100 ml wäßriger Lösung, justiert auf p_H 7,3, darin suspendiert kristallisierte Alkoholdehydrase entsprechend einem Proteingehalt von 25 mg/ml*.

Lösung IV. 3,4%ige Perchlorsäure (2,9 ml 70%ige Perchlorsäure Merck auf 100 ml).

Alkoholdehydrase ist, wie viele Fermente, empfindlich gegen Schwermetallverunreinigungen. Es empfiehlt sich daher, die Lösungen mit aus Glas oder Quarz redestilliertem Wasser anzusetzen (wenn stark CO₂-haltig, evakuieren oder auskochen) und „pro Analyti“-Qualitäten der benötigten Reagentien zu verwenden (Ammonsulfat p. a. wird zweckmäßig unter Zusatz eines Schwermetallbinders, z. B. Äthylendiamintetraacetat und wenig Ammoniak nochmals umkristallisiert).

Als Reaktionsgefäße verwenden wir Mischzylinder mit eingeschliffenem Glasstopfen, welche nicht wesentlich mehr als 5 ml fassen und bei 5 ml eine Eichungsmarke tragen.

0,5 ml Vollblut oder Serum werden zu 2 ml Perchlorsäure gegeben und in einem mit seinem Gummistopfen verschlossenen ausgedienten Venülenröhrchen 5 min bei 3000 Umdrehungen je Minute zentrifugiert. 0,1 ml der überstehenden klaren Flüssigkeit werden in die zuvor mit etwa 4,5 ml Lösung I beschickten Cylinder pipettiert und kurz umgeschwenkt. Nach Zugabe von 0,1 ml Lösung II und 0,02 ml Lösung III wird mit Lösung I zur Marke aufgefüllt, durchgemischt (ohne Schaum zu erzeugen) und 70 min bei einer Temperatur nicht unter 19° und nicht über 26° C stehengelassen. Ein Reagentienblindwert wird in gleicher

* Die Firma C. F. Boehringer & Söhne, Mannheim-Waldhof, Zweigstelle Tutzing, ist in dankenswerter Weise bemüht, die für die Bestimmung notwendigen Substanzen zur Verfügung zu stellen.

Weise unter Fortlassung des enteiweißten Serums angesetzt. Die Ablesung erfolgt nicht früher als nach 70 min und nicht später als nach 100 min bei der Wellenlänge 366 $m\mu$ in Cuvetten von 1 cm Schichtdicke. (Die Linie 366 $m\mu$ kann aus der Strahlung einer Quarzlampe mit den Filtergläsern UG 2 und WG 2 je 2 mm dick von Schott u. Gen. isoliert und mit einem Photoelement gemessen werden.) Die Eichkurve in Abb. 2 gibt die Beziehung zwischen der Extinktion (nach Abzug des Reagentienblindwertes) und dem Promillegehalt der vorgelegten Alkoholprobe. Bei Extinktionen, welche einem höheren Alkoholgehalt als 3‰ entsprechen würden, ist es erforderlich, die Untersuchungen nach Verdünnung des zu untersuchenden Materials zu wiederholen.

Fehlerbreite der Methode.

Tabelle 2 zeigt die Ergebnisse von 11 Bestimmungen, in denen an ein und demselben alkoholhaltigen Blut die vorstehend beschriebene Methode, jeweils mit der Enteiweißung anfangend, durchgeführt wurde. Der mittlere Fehler, wie er sich aus der Berechnung der mittleren quadratischen Abweichung ergibt, beträgt 1,2%, der wahrscheinliche Fehler der Einzelbestimmung 0,8%.

Tabelle 2. *Ergebnisse 11 getrennter Bestimmungen (einschließlich Enteiweißung) an einem alkoholischen Blut.*

| Extinktion (nach Abzug des Blindwertes) | Alkohol in ‰ |
|---|--------------|
| 1 | 0,258 |
| 2 | 0,262 |
| 3 | 0,262 |
| 4 | 0,263 |
| 5 | 0,259 |
| 6 | 0,263 |
| 7 | 0,255 |
| 8 | 0,262 |
| 9 | 0,256 |
| 10 | 0,264 |
| 11 | 0,262 |

Durchschnitt=0,926

S=0,011

σ =0,003

Wahrscheinlicher Fehler

der Einzelmessung=0,8%

Anfälligkeit der Fermentmethode gegen störende Faktoren.

In den Tabellen 3—8 sind die Ergebnisse von Versuchen zusammengefaßt, welche unternommen wurden, um die Spezifität der Methode und ihre Anfälligkeit gegen verschiedene Gruppen von Substanzen zu prüfen. Grundsätzlich können Fermentmethoden, bei denen der Ablauf der Reaktion an das Vorhandensein eines Katalysators gebunden ist, auf verschiedene Art und Weise zu Irrtümern Anlaß geben. Die wichtigsten dieser Möglichkeiten sind folgende:

1. Der Katalysator wirkt auch mit anderen, der gesuchten Substanz ähnlichen, Verbindungen.
2. Die gewünschte Reaktion wird durch ähnliche Verbindungen, welche den Katalysator blockieren, unterbunden (competitive inhibition).
3. Der Katalysator wird vergiftet oder zerstört.

Wir haben es deshalb unternommen, einen relativ breiten Kreis von Substanzen, teils theoretischer, teils rein praktischer Bedeutung, zu prüfen. Aus der Reihe der Alkohole und anderer Stoffe, welche eine Hydroxylgruppe tragen (Tabelle 3), reagieren in der Fermentmethode die gradkettigen höheren Alkohole und Isopropanol (Tabelle 7). Alle anderen Substanzen dieser Gruppe, welche wir geprüft haben, insbesondere Methanol (Tabelle 4) und die physiologisch wie praktisch wichtigen verzweigten Alkohole, stören die Äthylalkoholbestimmung

Tabelle 3. *Hydroxylgruppenhaltige Stoffe in der Fermentmethode.*

| Substanz (zugesezt 1‰ zu Serum mit 0,8‰ Äthanol) | Deviation des Analysenwertes % |
|--|--------------------------------|
| Äthylchlorhydrin . . . | +0,4 |
| Monoäthanolamin . . . | +1,1 |
| Glykol | ±0,0 |
| Cholin | +1,9 |
| Glycerin | -1,2 |
| Milchsäure | -1,2 |
| β-oxy-Buttersäure . . . | -2,3 |
| Serin | -0,4 |
| Threonin | +0,4 |

weder durch Reaktion noch durch Reaktionshemmung. Die Störung der Fermentmethode durch höhere gradkettige Alkohole hat für die Probleme dieser Arbeit keine größere praktische Bedeutung. Isopropanol findet in der Kosmetik Anwendung und kann außerdem in geringen Mengen (durch die Reduktion von Aceton) im endogenen Stoffwechsel entstehen. Wir zeigen deshalb eine weitere Tabelle (5), aus der hervorgeht, daß erst

Konzentrationen der Größenordnung 0,5‰ Fehler hervorrufen, welche die allgemeine Fehlergrenze der Methode erheblich überschreiten.

Tabelle 4. *Methanol in der Fermentmethode.*

| Im Ansatz | | Gemessene Extinktion | Entspricht Äthanol in ‰ | Differenz % |
|---------------|--------------|----------------------|-------------------------|-------------|
| Methanol in ‰ | Äthanol in ‰ | | | |
| 1,00 | 0,92 | 0,265 | 0,93 | ±0 |
| 1,00 | 1,38 | 0,395 | 1,39 | +0,7 |
| 3,00 | — | 0,002 | 0,01 | — |

Tabelle 5. *Isopropanol in der Fermentmethode.*

| Ansatz (Konzentration in ‰) | | | | |
|-----------------------------|---------|------------|--------------------|-------------|
| Isopropanol | Äthanol | Extinktion | entspricht Äthanol | Differenz % |
| — | 1,00 | 0,287 | 1,01 | — |
| 0,25 | 1,00 | 0,297 | 1,04 | 3 |
| 0,50 | 1,00 | 0,302 | 1,06 | 5 |
| 1,00 | 1,00 | 0,314 | 1,11 | 10 |
| 0,25 | — | 0,011 | 0,04 | — |
| 0,50 | — | 0,021 | 0,07 | — |
| 1,00 | — | 0,040 | 0,16 | — |

Eine weitere Gruppe von Substanzen, welche wir untersucht haben, enthält Stoffe, die die Alkoholbestimmung nach WIDMARK stören und die teils durch Stoffwechselstörung, z. B. Diabetes mellitus, teils durch äußere Einflüsse, z. B. Narkose, ins Blut gelangen können (Tabelle 6). Hier ist keine Störung gegeben.

Ein ähnliches Ergebnis zeigt eine große Gruppe von Desinfektionsmitteln (Tabelle 8), welche durchweg in der Widmarkmethode positiv erfaßt werden und die Fermentmethode durch Eiweißvergiftung hemmen könnten. Mit Ausnahme von Dijozol und Valvanol, welche stark äthylalkoholhaltig sind, störte keines der Desinfektionsmittel durch Reaktion oder Reaktionshemmung.

Die wegen ihrer forensischen Bedeutung vielfach aufgegriffene Frage des Äthylalkoholgehaltes des Nüchternblutes wird von REDETZKI und SAMLERT an anderer Stelle angesprochen.

Tabelle 6. *Ketonkörper und Narkosemittel in der Fermentmethode.*

| Substanz (zugeseztzt 1‰ zu Serum mit 0,8‰ Äthanol) | Deviation des Analysen- wertes % |
|--|---|
| Acetessigsäure | - 1,5 |
| Aceton | - 1,2 |
| Chloroform | - 1,5 |
| Äther | - 1,5 |

Tabelle 7. *Homologe des Äthanol in der Fermentmethode.*

| Substanz (zugeseztzt 1‰ zu Serum mit 0,8‰ Äthanol) | Deviation des Analysen- wertes % |
|--|---|
| Methanol | + 0,4 |
| n-Propanol | + 67,3 |
| Isopropanol | + 12,0 |
| Isobutanol | - 1,2 |
| (Methylpropanol) | |
| n-Butanol | + 44,3 |
| Isoamylalkohol (Gärungs-) | + 1,1 |

Tabelle 8. *Desinfektionsmittel in Ferment- und Widmarkmethode.*

| Substanz | Konzentration der Substanz in 1‰ Äthanol % | Abweichung des Analysenergebnisses gegen 1‰ Äthanol | |
|-----------------------|---|--|---------------------|
| | | Fermentmethode % | Widmarkmethode % |
| Dijozol* | konzentriert | mehr als + 300 | mehr als + 500 |
| Valvanol* | 10 | + 34,5 | mehr als + 500 |
| Bacillol | 3 | - 2,3 | mehr als + 500 |
| TB-Bacillol | 3 | - 3,4 | mehr als + 500 |
| Kresolan | 3 | - 3,4 | mehr als + 500 |
| Lysol | 1 | - 2,6 | mehr als + 500 |
| Septoforma | 3 | + 0,7 | mehr als + 500 |
| Infegrol | 3 | - 0,6 | mehr als + 500 |
| Alkalysol | 5 | - 2,0 | mehr als + 500 |
| Ipsiform | 2 | - 2,0 | mehr als + 500 |
| Pangrol | 1 | + 0,3 | + 380 |
| Pervalen | konzentriert | - 0,6 | + 300 |
| Kreolin | 3 | - 0,4 | mehr als + 500 |
| Sagrotan | 1,5 | - 1,7 | + 300 |
| Optiform | 3 | + 0,4 | mehr als + 500 |

* Präparate enthalten Äthylalkohol.

Vergleich der Widmark- und Fermentmethode bei experimentellen Alkoholbelastungen.

Für den Vergleich der Leistungsfähigkeit der neuen Methode mit jener der zur Zeit verbreitetsten Mikrodestillation nach WIDMARK erschien es uns zweckmäßig, experimentelle Alkoholbelastungen zu wählen. Insgesamt 19 Versuchspersonen wurden mit 40%igem Weinbrand innerhalb etwa $\frac{1}{2}$ Std derart belastet, daß ihr Blutalkoholgehalt nach der Verteilungsformel ($r = 0,7$) auf $1,5\frac{0}{100}$ hätte ansteigen müssen. Blutentnahmen mit Fluoridvenülen wurden vor der Belastung und dann in festgelegten Abständen, sich bis zu 4 Std erstreckend, durchgeführt (s. Kurven). Bei 12 Belastungen wurden Serumwerte (bei der Fermentmethode ohne Enteiweißung) verglichen (insgesamt 106 Vergleichspunkte). Bei 6 Belastungen wurden sowohl Serumbestimmungen (bei der Fermentmethode mit Enteiweißung) als auch Vollblutwerte miteinander verglichen (insgesamt je 49 Vergleichspunkte).

Die Versuche ergaben, sowohl was die Gestalt der Kurven, als auch das Verhältnis von Serum- zu Vollblutwerten anbetrifft, bemerkenswert verschiedene Verlaufstypen. Wir zeigen in Abb. 3 und 4 charakteristische Ergebnisse. Die Übereinstimmung der Werte beider Methoden bei den einzelnen Vergleichspunkten dagegen lag im Bereich der Fehlermöglichkeiten, welche sich für die Widmarkmethode als geringfügig höher als bei der Fermentmethode erwiesen haben.

Bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse wurde darauf verzichtet, die Nüchternwerte der Widmarkmethode, welche mit Sicherheit zum weit überwiegenden Teil „Nicht-Äthylalkoholsubstanzen“ entsprechen, von den Belastungswerten abzuziehen. Theoretisch wäre dies ohne Frage korrekter gewesen, da die Unspezifität bei der Widmarkmethode einen systematischen, additiven Fehler bedingt. Im Hinblick auf praktische Gesichtspunkte und wegen der Geringfügigkeit der

Tabelle 9. Auswertung der vergleichenden Bestimmungen an Serum und Vollblut.

| Substrat | Zahl der Vergleichswerte | Durchschnitt der Quotienten Widmark Ferment | σ | S |
|---|--------------------------|---|----------|-------|
| Serum (nicht enteiweißt) | 106 | 1,06 | 0,005 | 0,047 |
| Serum (bei der Fermentmethode enteiweißt) | 49 | 1,03 | 0,008 | 0,055 |
| Vollblut | 49 | 0,98 | 0,005 | 0,038 |
| | | Durchschnitt | | |
| Quotient $\frac{\text{Serumalkohol}}{\text{Vollblutalkohol}}$ (Fermentmethode) | 49 | 1,115 | 0,006 | 0,061 |

Korrekturen ist dies jedoch unterblieben. Die Nähe der Quotienten der Ergebnisse beider Methoden zu 1 ist somit gewissermaßen ein Ausdruck für die Spezifität der Widmarkmethode (Tabelle 9).

Diskussion.

Kaum eine andere Untersuchungsmethode wurde und wird täglich in foro in ihrer Güte und Spezifität derartig angegriffen und erneut getestet wie die Mikrodestillation nach WIDMARK. Wiederholt wurde festgestellt, daß es gegen den „Widmark“ keine nennenswerten Beanstandungen geben kann (unter anderen MUELLER^{14, 15}, WAGNER¹⁶, KALLFELZ¹⁷, KOLLER^{18, 19}, MÜLLER-HESS und HALLERMANN^{20, 21}, JUNGMICHEL²², ELBEL²³, BUHTZ²⁴). Trotzdem aber wird der erkennende Richter den Ergebnissen bei Einwendungen mit verständlicher Unsicherheit gegenüberstehen, weil außer dem Äthylalkohol andere flüchtige reduzierende Substanzen unter Umständen erfaßt wurden. Auch wenn die Schutzbehauptungen durch exakte Ermittlungen und Stellungnahmen eines Sachverständigen entkräftet werden können, semper aliquid haeret. Darüber dürften auch das fundierteste Gutachten und desgleichen nicht der Hinweis täuschen, daß jene beeinträchtigenden, d. h. leicht oxydierbaren Stoffe, vielfach nur Werte erzeugen, die innerhalb der Fehlergrenze des Verfahrens liegen. Die Häufung der Fehlerquellen könnte theoretisch jedoch dazu führen, daß dann innerhalb einer gewissen Unsicherheit rechtlich nicht uninteressante Abstriche an dem chemisch bestimmten Promillewert vorgenommen werden müssen — in dubio pro reo. Nach einer Narkose z. B., bei Aufbewahrung des Spritzenmaterials in einer Desinfektionslösung, die reduzierende Substanzen enthält, oder bei einer Methylalkoholvergiftung, könnte das Widmarkergebnis sogar wertlos werden.

Zur Übersicht über die endogenen und exogenen Fehler des Widmarkverfahrens werden diese referiert. Die Aufstellung soll verdeutlichen, daß ein echtes Bedürfnis besteht, jegliche Fehlermöglichkeiten durch Einführung einer *spezifischen* Äthylalkoholmethode auszuschließen.

Durch die Widmarkmethode werden an *endogenen* Substanzen erfaßt: Milchsäure, Glycerin, Acetaldehyd, Ammoniak, Fruchtsäuren, Fettsäuren (ELBEL²³). Diese leicht oxydierbaren Stoffe bringen zumeist nur minimale Werte hervor, die zudem noch im Bereich der Fehlergrenzen der Untersuchungsmethode liegen (0,03—0,06‰). Ähnliche Werte ergeben sich durch Aceton, Acetessigsäure, Oxybuttersäure. Wenn auch WIDMARK für Aceton bis zu 0,7‰ oder ARAKI²⁶ für Milchsäure bis 0,2‰ für Blutglycerin bis 0,95‰ gefunden haben, so können wir nur KOHBERG²⁷, WALTER²⁷, PALMIERI²⁸ bestätigen, daß in einem großen Material wesentliche Werte sich nie haben bestimmen lassen. Auch WIDMARK gibt für einen Diabetes *ohne* Koma Werte bis 0,35‰ an. Vielfach wird erheblicher Obstgenuß als Fehlerquelle angeführt. SCHWARZACHER³⁰, SCHÜCKLE²⁹ gaben hierfür Werte bis zu 0,18‰ an. Auch bei Hunger wollen FRAENKEL und NICOLAI²⁶ geringe

Menge reduzierender Stoffe gefunden haben. Bei Kachexie und chronischen Erkrankungen tritt nach KOHBERG²⁷ keine Erhöhung ein.

Die einzelnen Substanzen ergeben für sich praktisch unwesentliche Werte. Die Häufung der einzelnen Faktoren, wie sie in foro aufgeführt wird, könnte rein theoretisch zu Abstrichen von dem „Blutalkoholwert“ nach WIDMARK führen.

An *exogenen* Fehlerquellen gibt es ebenfalls eine Reihe von flüchtigen reduzierenden Substanzen. Jede Methode, die es ermöglicht, nur den Äthylalkohol zu erfassen, bedeutet deshalb einen Fortschritt; d. h., sobald fehlerhafte Desinfizienten, Narkosemittel u. v. a. die Analysenergebnisse nicht mehr stören und damit auch nicht eine gutachtliche Stellungnahme. Bekannt sind Analysenfehler durch Äther (GRAMEN³¹, KOLLER^{18, 9}, SAAR und PAULUS³², DOTZAUER³³) bis zu 1,50/10, Bromäthyl, Paraldehyd, Amylenhydrat. Durch verunreinigte Genußmittel und gewerbliche Gifte kann Bichromat ebenfalls reduziert werden. Um nur einige Substanzen zu nennen: Schwefelkohlenstoff, höhere Alkohole, Ester, chlorierte Produkte, Methylphenole, Methylalkohol, Aceton, Pyridin, Benzin, Benzol, Lacklösemittel usw., die zum Teil durch Einatmung aufgenommen und langsam eliminiert werden (FRAENKEL und NIKOLAI²⁶, ELBEL²³, SCHWARZ³⁴, KOHBERG²⁷). Aus der Reihe der Desinfektionsmittel sind es nach H. SCHULZE³⁵ Stoffe, die Formaldehyd, Phenolderivate, ätherische Öle, Weinsäure, H₂O₂ und Chlorate enthalten. Weiter können sich bei der Leichenfäulnis reduzierende Substanzen entwickeln (LANDSBERG³⁶, WAGNER¹⁶, WEINIG¹⁷), die interferometrische wie chemische Alkoholwerte vortäuschen (SCHWARZ³⁴). Nur bei einer regelrechten bakteriellen Fäulnis soll Alkohol entstehen (LANDSBERG³⁶). Sogar bei den nicht steril aufbewahrten Blutproben tritt, bei einigermaßen normalen Untersuchungsbedingungen, also im Gegensatz zu der Fäulnis in der Leiche, keine Erhöhung der Promillewerte ein (WIDMARK⁹, ELBEL²³)*.

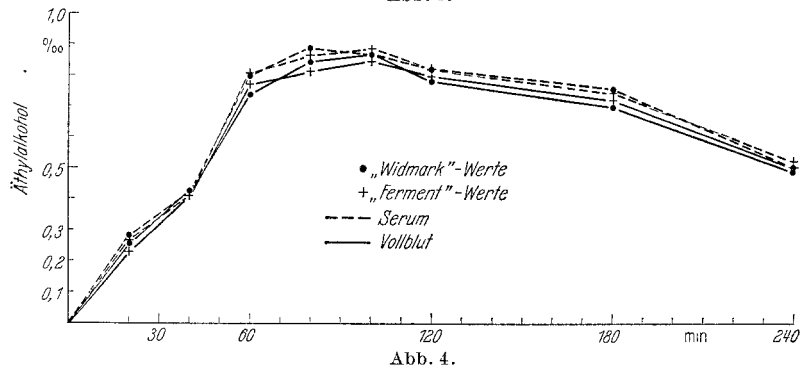
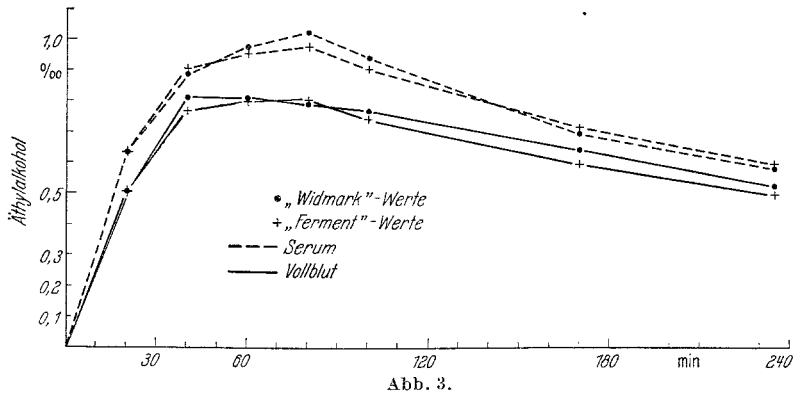
Um die Resultate zweier völlig differenter Untersuchungsmethoden, und zwar eine titrationschemische und die Fermentmethode, gegeneinander abwägen zu können, wird man zu der Spezifität, den mittleren Untersuchungsfehlern, der praktischen Verwertbarkeit, der zeitlichen Beanspruchung und dem Materialverbrauch — besonders im Hinblick auf Routineuntersuchungen — Bezug nehmen müssen.

Die Befunde der Fermentmethode, die uns ihre Präzision und Brauchbarkeit eindeutig bewiesen hat, geben die Gewißheit, nicht nur exakte Vergleichswerte zum „Widmark“, sondern darüber hinaus spezifische Äthylalkoholbestimmungen zu erhalten. Die Präzision wurde durch 204 Untersuchungen demonstriert. Der wahrscheinliche Fehler der Einzelbestimmungen betrug 0,8%.

Die Belastungskurven weisen besser als Worte auf die Übereinstimmung der Ergebnisse hin. Gleichzeitig wird dabei wieder einmal auf die Brauchbarkeit des Widmarkverfahrens hinzuweisen sein. Es konnten — bei Ausschaltung störender Faktoren für den Widmark — gleichsinnige Promillezahlen mit beiden Methoden, wie die zwei Kurven als Beispiel für viele zeigen, erhalten werden (Abb. 3 und 4). Der grundsätzliche Wert unserer Gegenüberstellung soll nun nicht etwa in der

* Orientierende Untersuchungen über diesen Komplex sind abgeschlossen und werden an anderer Stelle bekanntgegeben (REDETZKI, JOHANNSMEIERS, DOTZAUER.)

Bestätigung des „Widmark“ liegen, sondern darüber hinaus erstmalig darauf hinweisen, daß jetzt eine Untersuchungsmethode zur Verfügung steht, welche reine Äthylalkoholwerte routinemäßig faßt. Die Einführung der Fermentmethode würde Schutzbehauptungen vor Gericht in bezug auf endogene oder exogene Fehlerquellen hinfällig werden lassen, denn in den Fermentwerten liegt die größere Rechtssicherheit.



Da die Einwände gegen die Unspezifität (Narkose, Diabetes mellitus usw.) vielfach erst in der Verhandlung laut werden, müßten die Alkoholuntersuchungen völlig auf die Fermentmethode umgestellt werden.

Auch die in längeren Zeitabständen wiederholten Testungen einzelner Blutproben ergaben stets konstante Werte, so daß die Durchführung der Untersuchung nicht unmittelbar fristgebunden ist.

Bei Gegenüberstellung der Ergebnisse beider Verfahren — Widmark und Ferment — könnte man zudem in eleganter Weise Äthyl- wie Methylalkoholwerte im Blute und in den Körpersäften voneinander trennen. Damit würde ein Bedürfnis befriedigt, welches in der Zeit des Anfalles von Methylalkoholvergiftungen zu Ende des Krieges und in der Nachkriegszeit besonders stark war. In diesem Zusammenhang

muß darauf hingewiesen werden, daß jeweils nur geringe Mengen an Untersuchungsmaterial zur Verfügung zu stehen brauchen.

Es darf auch nicht unerwähnt bleiben, daß die Sachverständigen, die wegen der unspezifischen Ergebnisse zur größtmöglichen Sicherheit mit zwei Methoden (titrationschemisch und interferometrisch gearbeitet haben (SCHWARZ³⁴, SCHWARZ, DETTLING, SCHÖNBERG³⁷), jetzt durch die Fermentmethode Zeit und Material sparen, da die spezifischen Alkoholwerte eine parallele Untersuchung mit anderer Methode unnötig machen.

Zeitlich ist man darüber hinaus bei alltäglichen Untersuchungen nicht wesentlich stärker als bei der gewohnten Mikrodestillation gebunden. Dieser Punkt ist für Routineuntersuchungen nicht unwichtig, wenn auch die zeitliche Inanspruchnahme nie ausschlaggebend für oder gegen ein Verfahren sein darf. Wichtig sind allein: Spezifität und Präzision. Diese beiden Forderungen werden nach unserem Erachten von der Fermentmethode erfüllt.

Die Einarbeitung in eine Fermentmethode eröffnet einen weiteren interessanten und ausbaufähigen Arbeitskreis, deren Ausweitungen gerade für den Gerichtsmediziner noch nicht zu übersehen sind.

Wir haben uns mit Erfolg bemüht, die Fermentmethode auch für Vollblutuntersuchungen präzise und brauchbar zu gestalten, und zwar geschah dieses lediglich unter dem Gesichtspunkt einer Vergleichsmöglichkeit zu den gewohnten Vollblutwerten des „Widmark“. Fraglich bleibt es, ob es für die Alkoholuntersuchungen nicht zweckdienlicher, weil präziser wäre, *nur* die Serumwerte zu bestimmen und damit von dem Wechselspiel: Erythrocyten- : Serumalkohol Abstand zu nehmen. Der Alkohol ist nur an die flüssige Phase des Blutes gebunden; da man in der Venüle nie das natürliche Verhältnis der corpusculären zu den plasmatischen Elementen in der Hand hat, erscheinen uns die Serumwerte exakter. Ein Hinweis für die Richtigkeit unserer Auffassung dürfte die weite Streuung des Faktors zwischen Serum- und Vollblutwerten sein. KÜNKELE³⁸ ermittelte einen Durchschnittswert von 1,21 mit einer Streuung zwischen 1,12—1,31 und ELBEL²³ einen Faktor von 1,20 mit Werten zwischen 1,05—1,25. Man würde sich mit Bestimmungen im Serum zudem in den Rahmen der übrigen physiologisch-chemischen Untersuchungen einpassen, die nur im Serum erhoben werden.

Nicht zuletzt konnten wir bei unseren Untersuchungen herausstellen, daß Nüchternalkoholwerte im Blute nach den Ergebnissen der Fermentmethode praktisch nicht bestehen, und daß auch die Angabe fehlt, beim Diabetes mellitus würden solche gefunden werden. Interessanterweise sahen wir auch bei einer Großzahl von zum Teil schweren Acetonämien keine Widmarkwerte, die den Nüchternwert eindeutig überstiegen.

Bei der Feststellung der Nüchternwerte fielen als Gradmesser für die Exaktheit der Methode die Differenzen in den Ergebnissen beider Verfahren auf. Im Durchschnitt verhalten sich die Nüchternwerte von Ferment zu Widmark wie 1 : 30. Bei der Berechnung der Mittelwerte und der mittleren quadratischen Fehler nahmen wir bewußt Abstand davon, bei der Mikrodestillation den Nüchternwert von dem jeweiligen Ergebnis abzuziehen, da dies auch sonst bei der Darstellung der Blutalkoholwerte nach WIDMARK nicht üblich ist.

Anlage: *Testvorschriften.*

Alkoholdehydrase.

In 2 gründlich gereinigten Reagenzgläsern werden je $\frac{1}{30}$ ml Äthylalkohol, 4,9 ml Lösung I und 0,1 ml Lösung II der Arbeitsvorschrift (vgl. S. 18) gemischt. Die Extinktion der Mischung wird gemessen (1. Reagenzglas, Blindwert). Dann werden 0,02 ml mit redestilliertem kalten Wasser unmittelbar vor dem Test auf das 1000fache verdünnter Fermentlösung (in hohen Verdünnungen ist das Ferment nur kurze Zeit haltbar) in die Testlösung einpipettiert (Eintauchen der Pipette in die Lösung) und unter Anlaufenlassen einer Stoppuhr gemischt (ohne Schaum zu erzeugen). Der Ansatz wird sogleich in die Meßküvette (Schichtdicke 1 cm) überführt und die für einen Zuwachs der Extinktion von 0,1 (bei 366 $m\mu$) benötigte Laufzeit gestoppt.

Wir definieren als eine Fermenteinheit diejenige Fermentmenge, die in 5 ml Testlösung bei 25° C, der Wellenlänge 366 $m\mu$ und der Schichtdicke 1 cm in 100 sec einen Zuwachs der Extinktion um 0,1 erzeugt. Die im Präparat vorhandenen Einheiten errechnen sich daher nach der folgenden Formel:

$$\frac{100 \times \text{Verdünnungsfaktor}}{\text{gestoppte Zeit in sec}} = E.$$

Proteingehalt.

(modifizierte Biuret-Methode nach WEICHELBAUM¹⁰).

Proteinlösung enthaltend 1—6 mg Protein wird in einem Zentrifugenglas auf ein Volumen von 0,85 ml mit Wasser verdünnt und zu der Mischung 0,15 ml Trichloressigsäurelösung (3 molar) gesetzt. Nach dem Abzentrifugieren des Eiweißniederschlages und sorgfältigem Entfernen der überstehenden Lösung, wird der Eiweißniederschlag in 5 ml Wasser aufgewirbelt und mit 5 ml Biuret-Reagenz vermischt.

Herstellung des Biuret-Reagens: 9 g Seignettesalz werden in etwa 400 ml 0,2 n NaOH (karbonatfrei, aus gesättigter, abgestandener NaOH bereitet) gelöst, dann nacheinander zu dieser Lösung 3,0 g feingepulvertes $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ p. a. und 5,0 g KJ p. a. gefügt. Jedes der Salze

muß jeweils vor Zufügen des nächsten gelöst sein. Die Mischung wird mit 0,2 n NaOH auf 1000 ml aufgefüllt; sie ist in einer braunen Flasche unbegrenzt haltbar.

Von der nach 30 min (Zimmertemperatur) gemessenen Extinktion wird der (konstante) Blindwert der Mischung von 5 ml Wasser und 5 ml Biuret-Reagenz abgezogen.

Zuwachs der Extinktion ($546 \mu\mu$, $d=2 \text{ cm}$) $\cdot 1,7 = \text{mg Protein}$ in der Bestimmung.

Hochgereinigte Alkoholdehydrase: Die in der vorstehenden Arbeit verwendeten Alkoholdehydrasepräparate enthielten 800—1000 Fermenteinheiten im Milligramm Protein.

Diphosphopyridinnucleotid.

In einem gründlich gereinigten Reagenzglas werden $\frac{1}{30}$ ml Alkohol, DPN-Lösung, enthaltend etwa $\frac{1}{2}$ mg DPN und genügend Lösung I der Arbeitsvorschrift (vgl. S. 18), um das Volumen der Lösung auf 5 ml zu ergänzen, gemischt. Die Mischung wird in eine Meßküvette gegeben, der Blindwert abgelesen und 0,02 ml der Fermentlösung III (Arbeitsvorschrift S. 18) untermischt. Aus der Differenz des nach wenigen Minuten erreichten Endwertes der Extinktion gegen den Blindwert errechnet sich die in der Bestimmung befindliche DPN-Menge wie folgt: Zuwachs der Extinktion ($366 \mu\mu$, $d=1 \text{ cm}$) $\cdot 0,96 = \text{mg DPN}$ in der Bestimmung.

Literatur.

- ¹ BÜCHER, TH., u. H. REDETZKI: *Klin. Wschr.* **29**, 615 (1951). — ² WARBURG, O.: *Erg. Enzymforsch* **7**, 210 (1938). — ³ WARBURG, O.: Wasserstoffübertragende Fermente. Freiburg 1949. — ⁴ NEGELEIN, E., u. H. J. WULF: *Biochem. Z.* **293**, 351 (1937). — ⁵ HORECKER, B. L., and A. KORNEBERG: *J. of Biol. Chem.* **175**, 385 (1948). — ⁶ RACKER, E.: *J. of Biol. Chem.* **184**, 313 (1950). — ⁷ WARBURG, O., u. W. CHRISTIAN: *Biochem. Z.* **285**, 156 (1936). — ⁸ WIDMARK, E.: *Die theoretischen Grundlagen usw.* Berlin u. Wien: Urban & Schwarzenberg 1932. — ⁹ WIDMARK, E.: *ABDERHALDENS Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden*, Abt. IV, Teil 12/II. 1938. — ¹⁰ WEICHELBAUM: *Amer. J. Clin. Path., Techn. Sec.* **10**, 40 (1946). — ¹¹ WILLIAMSON, S., and D. E. GREEN: *J. of Biol. Chem.* **135**, 345 (1940). — ¹² WARBURG, O., u. W. CHRISTIAN: *Biochem. Z.* **287**, 291 (1936). — ¹³ NEUBERG, C., E. STRAUSS and L. E. LIPKIN: *Arch. of Biochem.* **4**, 101 (1944). — ¹⁴ MUELLER, B.: *Dtsch. Z. gerichtl. Med.* **24**, 114 (1935). — ¹⁵ MUELLER, B.: *Dtsch. Justiz* **100**, 16, 617 (1938). — ¹⁶ WAGNER, K.: *Dtsch. Z. gerichtl. Med.* **26**, 276 (1936). — ¹⁷ KALLFELZ, W.: *Jur. Wschr.* **1937**, 2336. — ¹⁸ KOLLER, J.: *Dtsch. Z. gerichtl. Med.* **26**, 234 (1936). — ¹⁹ KOLLER, J.: *Brunns' Beitr.* **162**, 176 (1935). — ²⁰ MÜLLER-HESS, u. W. HALLERMANN: *Jkurse ärztl. Fortbildg* **27**, H. 9 (1936). — ²¹ HALLERMANN, W.: *Dtsch. Z. gerichtl. Med.* **28**, 83 (1937). — ²² JUNGMICHEL, G.: *Alkoholbestimmungen im Blut.* Berlin: Carl Heymann 1933. — ²³ ELBEL, H.: *Die wissenschaftliche Grundlage der Beurteilung von Blutalkoholbefunden.* Leipzig: Georg Thieme 1935. — ²⁴ BUHTZ, G.: *Der Verkehrsunfall.* Stuttgart: Ferdinand Enke 1938. — ²⁵ GORDONOFF: *Die Alkoholfrage in der Schweiz*, Bd. I.

H. 2. Basel: Benno Schwabe & Co. — ²⁶ FRAENKEL, P., u. H. W. NICOLAI: Dtsch. Z. gerichtl. Med. **11**, 134 (1928). — ²⁷ KOHBERG, E.: Dtsch. Z. gerichtl. Med. **15**, 75 (1930). — ²⁸ PALMIERI: Zit. bei KOHBERG. — ²⁹ SCHÜCKLE: Wien. klin. Wschr. **1937**, 780. — ³⁰ SCHWARZACHER: Dtsch. Z. gerichtl. Med. **26**, 302 (1937). — ³¹ GRAMEN: Zit. bei E. POULSSON, Lehrbuch der Pharmakologie, 11. Aufl. Leipzig: S. Hirzel 1937. — ³² SAAR, H., u. W. PAULUS: Beitr. gerichtl. Med. **16**, 114 (1942). ³³ DOTZAUER, G.: Dtsch. Z. gerichtl. Med. **40**, 170 (1950). — ³⁴ SCHWARZ, F.: Die Alkoholfrage in der Schweiz, Bd. 1, H. 2. Basel: Benno Schwabe & Co. — ³⁵ SCHULZE, A.: Diss. Hamburg 1951. — ³⁶ LANDSBERG, A.: Z. physiol. Chem. **41**, 505 (1904). — ³⁷ DETTLING, I., S. SCHÖNBERG u. F. SCHWARZ: Lehrbuch der gerichtlichen Medizin Basel: S. Karger 1951. — ³⁸ KÜNKELE, F.: Dtsch. Z. gerichtl. Med. **26**, 241 (1936). ³⁹ WEINIG, E.: Dtsch. Z. gerichtl. Med. **26**, 293 (1936).

Fräulein H. KOOPMANN danken wir für ihre freundliche Mithilfe bei der Durchführung der Untersuchungen.

Dozent Dr. G. DOTZAUER, (24a) Hamburg,
Inst. f. gerichtl. Med. u. Kriminalistik d. Univ.