

Aus dem Institut für gerichtliche Medizin und Kriminalistik der Universität
Erlangen (Vorstand: Prof. Dr. Dr. E. WEINIG).

Bestimmung von Äthanol neben Methanol in Flüssigkeiten und Organen.

Von

E. WEINIG und G. NEUGEBAUER.

Die von K. AGNER und E. BELFRAGE (1947) veröffentlichte spezifische Mikromethode zur quantitativen Methanolbestimmung im Blut stellt für die Toxikologie der Methanolvergiftung eine außerordentliche Bereicherung dar. Das Verfahren beruht auf einer von E. Z. EGGRIWE (1937) angegebenen, sehr empfindlichen und spezifischen Reaktion, die mit Formaldehyd unter Zugabe von Chromotropsäure (1,8-Dioxynaphthalin-3,6-Disulfonsäure) in 72%iger Schwefelsäure bei 60° auftritt.

K. AGNER und E. BELFRAGE gehen von 0,2 cm³ Blut aus, das sie mit 0,2 cm³ einer verdünnten Heparinlösung (0,2 cm³ einer 5%igen Heparinlösung auf 100 cm³ H₂O) und 0,2 cm³ 25%iger Trichloressigsäure versetzen. Nach dem Zentrifugieren wird zu 0,1 cm³ des Zentrifugats 0,1 cm³ einer in 5%iger Phosphorsäure gesättigten Kaliumpermanganatlösung gegeben und die Mischung 20 min bei Zimmertemperatur verschlossen stehengelassen. Danach wird Schwefeldioxydgas bis zur Entfärbung eingeleitet. Nach Zugabe von 4 cm³ Chromotropsäurelösung (100 mg in 20 cm³ 72%iger H₂SO₄) wird die Probe bei verschlossenem Gefäß 30 min *im* kochenden Wasserbad erhitzt. Nach Abkühlung auf Zimmertemperatur wird die Intensität der Farblösung mit dem Zeiß-Pulfrich-Photometer bestimmt, wobei durch Verwendung von geeigneten Filtern der Normalblutwert berücksichtigt wird.

Nach dem Bekanntwerden dieser spezifischen Methode lag es nahe, sie unter gleichzeitiger Anwendung des Verfahrens von E. M. P. WIDMARK zur Bestimmung von Äthanol neben Methanol heranzuziehen.

Unter den bisherigen Methoden zur Trennung von Äthanol und Methanol, die in neuerer Zeit veröffentlicht wurden, hat sich die von O. SCHMIDT angegebene bei der Untersuchung konzentrierter Flüssigkeiten sehr bewährt. Bei der Analyse von Organen und Körperflüssigkeiten war jedoch zu viel Ausgangsmaterial (1000—1500 g) erforderlich; außerdem mußten mehrmalige Destillationen zum Zwecke der Anreicherung und Reinigung vorgenommen werden, um die für die Dichte und Gefrierpunktbestimmung geeigneten Konzentrationen und Reinheitsgrade zu erzielen. Bei der Untersuchung des Blutes von Lebenden oder in Fällen, in denen nur wenig Untersuchungsmaterial zur Verfügung stand, konnte sie daher nicht oder nur begrenzt angewendet werden. Es bestand daher ein Bedürfnis nach einer spezifisch und einfach arbeitenden Methode zur Trennung von Methanol und Äthanol in größeren Verdünnungen¹.

¹ Wie neuerliche Untersuchungen im Institut ergeben haben, tritt eine ähnliche, jedoch um ein Vielfaches schwächere Farbreaktion auch mit n-Propanol auf. Die Abwesenheit von n-Propanol ist deshalb qualitativ zu sichern.

Bevor uns die Arbeit von K. AGNER und E. BELFRAGE bekannt war, hatten wir Versuche unternommen, die relative Trägheit der Bichromatoxydation des Methanols gegenüber Äthanol für eine Bestimmung der beiden Alkohole nebeneinander zu verwenden. Diese Versuche wurden jedoch nach der nunmehr bestehenden Anwendbarkeit der Methode von K. AGNER und E. BELFRAGE nicht mehr weitergeführt, da sie vergleichsweise nicht mehr spezifisch genug erschienen.

Der von uns vorgesehene Weg soll sich wie folgt gliedern:

1. Destillation bei saurerer Reaktion unter Hg-Salz-Zusatz.
2. Bestimmung des Gesamtreduktionswertes des Destillates im Widmark-Kölbchen mit Hg-Salz- und Alkalizusatz unter den von N. v. BILDSTEN und M. NEYMARK für die Methanolbestimmung angegebenen Bedingungen.

3. Colorimetrische Methanolbestimmung im Destillat nach K. AGNER und E. BELFRAGE.

4. Errechnung des Äthanolwertes aus dem Gesamtreduktionswert und dem auf colorimetrischem Wege gewonnenen Methanolgehalt.

Zur Beschreitung dieses Weges mußten zunächst folgende Vorfagen geklärt werden: Ist der von N. v. BILDSTEN *oder* der von M. NEYMARK angegebene Faktor zur Berechnung des Methanolgehaltes nach der Methode von E. M. P. WIDMARK richtig und sind die Bedingungen für die Methanolbestimmung im Blut nach K. AGNER und E. BELFRAGE auf Destillate anwendbar.

Bekanntlich hat N. v. BILDSTEN als erster die Methode von E. M. P. WIDMARK für die Bestimmung von Methanol angewandt. Er hat dabei die Bedingungen insofern abgeändert, als er die Reaktionstemperatur von 60° auf 70° erhöhte und statt 2 Std $2\frac{1}{2}$ Std erhitzte. Für die Berechnung gab er einen Faktor von 1,33 an. M. NEYMARK hat jedoch auf Grund ihrer Untersuchungen festgestellt, daß dieser Faktor falsch sein muß und hat ihn mit 0,56 angegeben. Dieser Faktor ist im Rahmen einer Inaug.-Diss. von H. J. SCHMIDT am hiesigen Institut und durch uns an etwa 100 Untersuchungen nachgeprüft worden. Hierbei konnten wir einen Faktor von 0,565 ermitteln, der somit halb so groß ist, wie der von E. M. P. WIDMARK für Äthanol mit 1,13 angegebene Faktor.

Zur Beantwortung der Frage, ob die Methode von K. AGNER und E. BELFRAGE ohne weiteres in Destillaten angewendet werden kann, wurden Versuche an reinen Methanollösungen, jedoch ohne Zusätze von Heparin und Trichloressigsäure, vorgenommen. Denn diese Zusätze sind bei Untersuchungen von Destillaten nicht notwendig; auch vereinfacht sich der Untersuchungsgang insofern, als die Notwendigkeit des Hämolyisierens, Enteiweißens und Zentrifugierens entfällt. Da für unsere colorimetrischen Bestimmungen nur ein einfaches Hellige-Duboscq-Colorimeter zur Verfügung stand, ergaben sich einige technische Änderungen, indem wir nicht mit der Differenz von verschiedenen

Filtern arbeiteten, wie dies von K. AGNER und E. BELFRAGE mit dem Zeiß-Pulfrich-Photometer durchgeführt wurde, sondern gegen eine Methanolvergleichslösung ablesen. Dabei stellte sich heraus, daß eine Vergleichslösung für den Bereich von 0—2 ‰ Methanol nicht genügt. Es hat sich vielmehr als zweckmäßig erwiesen, für Konzentrationen zwischen 0,5 und 1,5 ‰ eine 1 ‰ige und für Konzentrationen zwischen 1—2 ‰ eine 1,5 ‰ige Vergleichslösung zu wählen. Für Konzentrationen unter 0,5 ‰ liest man am besten gegen eine 0,3 ‰ige Vergleichslösung ab. Bei Konzentrationen über 2 ‰ erhält man beim Hellige-Duboscq-

Colorimeter ungenauere Werte, weshalb bei stärkeren Konzentrationen der Destillate bzw. Untersuchungsflüssigkeiten entsprechend verdünnt werden muß.

Für reine Methanollösungen wurden mit dem Hellige-Duboscq-Colorimeter bei Einstellung der Eichlösung auf den Skalenwert 10 folgende Skalenwerte für die Vergleichslösungen erhalten (Tabelle 1).

Als Kurven dargestellt ergeben sich in den gewählten Vergleichskonzentrationsbereichen 3 nahezu ideale Geraden. Da somit die Farb-

intensität direkt proportional der Methanolkonzentration ist, ist das BEERSche Gesetz anwendbar. Die Konzentration läßt sich ohne das

Anlegen von Eichkurven nach der Formel $\frac{c_1 \cdot d_1}{d_2} = c_2$ berechnen, wenn man in den gewählten Vergleichsbereichen arbeitet. Hierbei bedeuten c_1 die bekannte, c_2 die unbekannte Methanolkonzentration, während d_1 und d_2 die beiden dazugehörigen Skalenwerte darstellen. Außerhalb dieser Vergleichsbezirke schwanken die Werte stark, da hierbei die Farbunterschiede zwischen Probe- und Vergleichslösung zu groß sind und kleinere Unterschiede nicht mehr genau genug festgestellt werden können.

Beim Colorimetrieren mit diesem Gerät ist es zweckmäßig, die Skaleneinstellung der unbekanntes Lösung (d_2) konstant zu halten und zwar möglichst auf einem mittleren Wert des Ablesungsbereiches. Bei unseren Messungen würde der Trommelwert 10 gewählt. Denn nur so erhält man gerade Eichkurven.

In dieser Weise wurden die Methanolkonzentrationen von hergestellten Testlösungen aus den Skalenablesungen errechnet, wobei sich folgendes ergab (Tabelle 2).

Tabelle 1.

Eichlösung ‰	Vergleichs- lösung ‰	Skalenwert
0,1	0,3	3,3
0,2	0,3	6,7
0,4	0,3	13,4
0,5	1,0	5,0
0,8	1,0	8,0
1,1	1,0	11,0
1,4	1,0	14,0
1,0	1,5	6,6
1,4	1,5	9,3
1,6	1,5	11,4
2,0	1,5	13,4

Somit hat sich bei der Bearbeitung der 2. Vorfrage ergeben, daß die Methanolbestimmung nach K. AGNER und E. BELFRAGE im Destillat anwendbar ist.

Bei dem von uns vorgesehenen Weg gingen wir von der Forderung aus, daß er für Getränke, Organe und Körperflüssigkeiten anwendbar sei.

Soweit es sich um Getränke handelt, die einen mehr oder minder hohen Methanol- und Äthanolgehalt aufweisen, ist es leicht möglich, die erwünschte Konzentration zu erzielen.

Bei der Untersuchung von Leichenblut oder Organen von an Methanolvergiftung zu Tode gekommenen Personen empfiehlt es sich, die vorbereitende Destillation nach dem für die Äthanolbestimmung im Leichenblut angegebenen Verfahren von E. WEINIG vorzunehmen. Hiernach werden 5 g Blut, Urin oder Organbrei mit 25 cm³ H₂O, 5 cm³ 10%iger Na₂WO₄-Lösung und 10 cm³ einer 10%igen HgSO₄-Lösung in 2n-H₂SO₄ versetzt und auf 10 cm³ überdestilliert. Von dem De-

Tabelle 2.

Methanol- testlösung	Vergleichs- lösung c ₁	Skalenwert d ₁	Gefundene Methanolkon- zentration c ₂
‰	‰		‰
0,10	0,30	3,3	0,10
0,20	0,30	6,7	0,20
0,40	0,30	13,4	0,40
0,50	1,00	5,0	0,50
0,60	1,00	6,1	0,61
0,80	1,00	8,0	0,80
0,90	1,00	9,2	0,92
1,00	1,00	10,0	1,00
1,10	1,00	11,0	1,10
1,20	1,00	12,1	1,21
1,30	1,00	13,0	1,30
1,40	1,00	14,0	1,40
1,00	1,50	6,6	1,00
1,10	1,50	7,3	1,10
1,20	1,50	8,0	1,20
1,40	1,50	9,3	1,40
1,60	1,50	10,7	1,60
1,70	1,50	11,4	1,71
1,80	1,50	11,9	1,79
1,90	1,50	12,7	1,90
2,00	1,50	13,4	2,00

stillat werden 3mal 0,1 cm³ für die Widmarkbestimmung unter Zusatz von je 1 Tropfen gesättigter Sublimatlösung und 1 Tropfen 10%iger Natronlauge in die Nöpfchen der Widmarkkölbchen bei 70° 2½ Std verbracht und daneben 2mal 0,1 cm³ Destillat für die Methanolbestimmung nach K. AGNER und E. BELFRAGE verwendet.

Durch die von E. WEINIG angegebenen Bedingungen der vorbereitenden Destillation im Säuren und der isothermen Destillation im Alkalischen im Widmarkkölbchen (als Modifikation des Verfahrens von FRIEDEMANN-KLAAS) werden unter anderem Acetonkörper beseitigt, die meist bei tödlich auslaufenden Methanolvergiftungen auftreten und störend wirken können (O. RÖE). Bei typisch endenden Methanolvergiftungen wäre eine Bestimmung von Äthanol neben Methanol praktisch nicht nötig, da der Äthylalkohol bei einem Todeseintritt nach

1—2 Tagen fast stets abgebaut ist. Weil jedoch in neuerer Zeit auf die Anregung von O. RØE zuweilen bei einer Methanolvergiftung aus therapeutischen Gründen Äthylalkohol verabreicht wird, ist eine Trennung von Methanol und Äthanol notwendig. Bei kurz nach der letzten Alkoholaufnahme eingetretenem Tod ist eine Bestimmung der beiden Alkohole nebeneinander unbedingt erforderlich, um das Überwiegen der Wirkung des einen oder anderen Alkohols gerichtsmedizinisch beurteilen zu können. Hierbei sei darauf hingewiesen, daß die in der Literatur niedergelegten Werte für den Methylalkoholgehalt von Blut, Urin und Leichenteilen mit großer Zurückhaltung anzusehen sind, vor allem dann, wenn die Bestimmungsmethode nicht angegeben wurde. Angaben über die Beziehungen zwischen Methanolkonzentration im Blut und klinischen Erscheinungen, sowie zwischen Methanolkonzentration im Blut und tödlich auslaufenden Vergiftungen bedürfen einer Nachprüfung unter Anwendung des von K. AGNER und E. BELFRAGE gewonnenen methodischen Fortschrittes.

Um Äthanol neben Methanol zu bestimmen, wird mit dem erhaltenen Destillat eine Widmarkbestimmung unter den von N. v. BILDSTEN und M. NEYMARK angegebenen Bedingungen durchgeführt, wodurch Äthanol + Methanol erfaßt werden. Der Thiosulfatverbrauch wird auf Äthanol mit dem Faktor 1,13 berechnet. Hierauf wird der inzwischen colorimetrisch ermittelte Methanolgehalt von dem Widmarkwert in Abzug gebracht. Dies geschieht dadurch, daß man zunächst den Methanolgehalt durch Multiplikation mit $\frac{1,13}{0,565} = 2$ auf Äthanol umrechnet und diesen Betrag vom Widmarkwert subtrahiert.

Zur Überprüfung der Gangbarkeit dieses Weges wurden als Testlösungen Gemische mit wechselndem Methanol(M)- und Äthanol(Ä)-gehalt untersucht, wobei sich folgende Zahlenwerte in Gewichtspromille ergaben (Tabelle 3).

Tabelle 3.

Testlösung		Widmarkwert (Faktor 1,13) <i>A</i>	M-Gehalt nach AGNER und BELFRAGE <i>B</i>	Ä-Gehalt $A - \left(B \cdot \frac{1,13}{0,565} \right)$
M-Gehalt	Ä-Gehalt			
0,20	1,80	2,20	0,20	1,80
0,50	1,50	2,50	0,48	1,54
0,80	1,20	2,80	0,78	1,24
1,00	1,00	3,00	1,00	1,00
1,30	0,70	3,30	1,30	0,70
1,50	0,50	3,50	1,50	0,50

Analysenvorschrift.

Nachdem in der oben beschriebenen Weise 5 g Blut, Organbrei oder sonstiges Material in schwefelsaurer Lösung unter Zusatz von Quecksilbersulfat auf 10 cm³ überdestilliert wurden (bei reinen Methanol-Äthanolgemischen kann die Destillation unterbleiben), wird das Destillat wie folgt behandelt:

Drei Proben des Destillates von je 0,1 cm³ werden in die Nöpfchen von 3 Widmarkkölbchen unter Zusatz von je 1 Tropfen heißgesättigter Sublimatlösung und 1 Tropfen 10%iger Natronlauge verbracht. Nach 2 $\frac{1}{2}$ stündigem Erhitzen bei 70° wird in der nach WIDMARK üblichen Weise verfahren. Der so erhaltene Thiosulfatverbrauch wird zunächst mit dem Faktor 1,13 auf Äthanol berechnet.

Zwei Proben des Destillates von je 0,1 cm³ werden mit je 0,1 cm³ in 5%iger Phosphorsäure gesättigter Kaliumpermanganatlösung versetzt, kurz durchgeschüttelt und 20 min bei Zimmertemperatur verschlossen stehengelassen. Dann wird Schwefeldioxyd bis zur Entfärbung der Lösung eingeleitet und nun werden 4 cm³ Chromotropsäurelösung (100 mg in 20 cm³ 72%iger H₂SO₄) hinzugesetzt. Die gut durchmischte und verschlossene Probe wird 30 min im kochenden Wasserbad erhitzt. Nach Abkühlen der Lösung auf Zimmertemperatur wird colorimetriert.

Bei Verwendung eines Hellige-Duboscq-Colorimeters werden 3 in gleicher Weise behandelte Vergleichslösungen mit einem Methanolgehalt von 0,3, 1 und 1,5 $\frac{0}{100}$ hergestellt. Die Vergleichslösungen werden jedesmal vor dem Versuch aus einer 10%igen (gewichtszusammensetzenden) Methanol-Stammlösung hergestellt, da stärker verdünnte Lösungen nur kurzfristig konstant bleiben. Beim Arbeiten mit diesem Gerät ist ferner zu beachten, daß die Ablesung unter Vorschalten eines Rotfilters der Filterzusammenstellung Nr. 1683 RGB durchgeführt wird. Auch muß die Einstellung auf Farbgleichheit mit dem Rotfilter vor dem Versuch erfolgen, da sonst die Werte erheblich von der Eichgeraden abweichen würden. Ferner ist darauf zu achten, daß die Beleuchtungsspannung während des Colorimetrierens konstant ist.

Der Methanolgehalt des Destillates wird nun mit Hilfe der Skalenablesung unter Verwendung der oben angegebenen Formel $\frac{c_1 \cdot d_1}{d_2} = c_2$ berechnet.

Zur Berechnung des Äthanolgehalts wird der Methanolgehalt in einen Reduktionswert für Äthanol umgerechnet und von dem auf Äthanol berechneten Widmarkwert subtrahiert.

Da durch die Destillation eine Verdünnung des Ausgangsmaterials von 1:2 eingetreten ist, sind Methanol- und Äthanolgehalt der Destillate mit 2 zu multiplizieren.

Die Genauigkeit dieses Verfahrens entspricht etwa derjenigen der Widmarkmethode.

Zusammenfassung.

Zur Bestimmung von Äthanol neben Methanol in Flüssigkeiten und Organen wird eine Methode angegeben, die auf einer Kombination der colorimetrischen Methanolbestimmung nach K. AGNER und E. BELFRAGE mit dem Widmarkverfahren unter besonderen Bedingungen beruht.

Literatur.

- AGNER, K., u. E. BELFRAGE: Acta physiol. scand. (Stockh.) **13**, 87 (1947). — BILDSTEN, N. v.: Biochem. Z. **146**, 361 (1924). — EEGRIWE, E.: Z. anal. Chem. **110**, 22 (1937). — NEYMARK, M.: Skand. Arch. Physiol. (Berl. u. Lpz.) **3**, 227 (1936). — RØE, O.: Methanol Poisoning. Its clinical course pathogenesis and treatment. Oslo 1946. — SCHMIDT, H. J.: Zur Frage des chemischen Nachweises der Methanolvergiftung. Inaug.-Diss. Erlangen 1949. — SCHMIDT, O.: Dtsch. Z. gerichtl. Med. **38**, 87 (1944). — WEINIG, E.: Dtsch. Z. gerichtl. Med. **40**, 318 (1951). WIDMARK, E. M. P.: Fortschr. naturwiss. Forschg. N. F. **1931**, H. 11.

Prof. Dr. E. WEINIG, Institut für gerichtliche Medizin und Kriminalistik
der Universität Erlangen.