

Aus dem Institut für gerichtliche Medizin der Universität Bonn  
(Direktor: Prof. Dr. med. H. ELBEL).

## Untersuchungen über die Grundlagen der Alkoholbestimmungsmethode von Vidic.

Von

W. PAULUS und H. J. MALLACH.

Mit 1 Textabbildung.

(Eingegangen am 18. Mai 1955.)

Versuche, den Alkoholgehalt auf photometrischem Wege zu bestimmen, reichen weit zurück. GOUBAU, GIBSON und BLOTNER, NEWMAN und Mitarbeiter, SHAPIRO, JETTER, CASIER und DELAUNOIS und GRÜNER versuchten in einer Modifikation des Widmark-Verfahrens an Stelle der *indirekten* Bestimmung durch Titration des überschüssigen Dichromats das reduzierte Chrom auf *direktem* Wege photometrisch zu erfassen. Wenn diese Methode, bei der sich der Vorlagefehler eliminieren läßt, nicht das erwartete Echo in der Praxis fand, so dürfte nach *eigenen Untersuchungen* der Grund im optischen Verhalten der beiden Oxydationsstufen des Chroms zu suchen sein, da die *grünen* Cr-III-Verbindungen nur geringe Maxima im sichtbaren Spektralbereich zeigen und bei Gegenwart von *gelben* bis *roten* Cr-VI-Verbindungen von diesen stark beeinflußt werden.

Versuche, das Oxydationsmittel Chrom durch andere zu ersetzen, wurden von ANDERSON, GREENBERG und KEATER sowie von GINGRAS und GAUDRY unternommen. Erst kürzlich beschrieb nun VIDIC (1) ein neues Verfahren und ergänzte es bald darauf in einer 2. Mitteilung durch weitere Untersuchungen (2). Im Prinzip handelt es sich um ein Vanadin-Oxydationsverfahren. Vanadin hat gegenüber Chrom den Vorteil, daß seine Oxydationsstufen — im vorliegenden Falle die *gelbe* 5wertige und die *blaue* 4wertige Stufe — im sichtbaren Spektralbereich Absorptionsmaxima zeigen, die sich weder überdecken noch beeinflussen. Es handelt sich um ein *direktes* Verfahren. Der im Widmark-Verfahren bekannte Vorlagefehler wird hier eliminiert und der Alkohol *unmittelbar* durch *photometrische* Messung des im stöchiometrischen Verhältnis gebildeten *blauen* Vanadylsulfats bestimmt. Vorteilhaft ist auch hier die vom Widmark-Verfahren her bekannte Vereinigung von Destillation und Oxydation des Alkohols in einem Arbeitsgang, wodurch weitere Fehlerquellen, wie sie unter anderem im Friedemann-Klass-Verfahren erscheinen können, vermieden werden.

VIDIC gab an, bei geeigneter Vorlage von 2 oder 3 ml Vanadin-Schwefelsäure alkoholhaltige Proben über 3 Std im Thermostaten bei 89° C zu belassen und nach Abkühlen der Proben auf ein bestimmtes Quantum mit bidestilliertem Wasser aufzufüllen. Nach erneutem Abkühlen können die Proben im „Lange-Colorimeter“ mit entsprechenden Filtern bei 650—700 nm gemessen werden. Als wahrscheinlichen Fehler nannte er 1,28% für eine 0,7<sup>0</sup>/<sub>100</sub>ige und 0,86% für eine 2,05<sup>0</sup>/<sub>100</sub>ige Alkoholstandardlösung.

Wir haben uns nun die Aufgabe gestellt, die Grundlagen des vorliegenden Verfahrens experimentell zu untersuchen. Es handelt sich dabei um spektralphotometrische Untersuchungen der verwendeten Reagentien, Prüfung des Vanadylsulfats auf die Gültigkeit des BEERschen Gesetzes, reaktionskinetische Untersuchungen des Alkohol-Vanadinsäure-Redox-Systems, Aufstellung einer Alkoholeichkurve und Prüfung der Fehlerbreite für Alkoholstandardlösungen von 0,1—4,0 ‰ und schließlich um Prüfung der Alkoholspezifität.

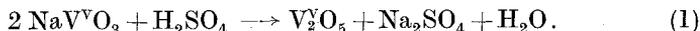
#### A. Die chemischen Reaktionen des Verfahrens.

Der vorliegenden Methode liegen folgende Reaktionsabläufe zugrunde:

Die *Metavanadate* (1/1-Vanadate) setzen sich zusammen aus den Oxyden einwertiger Metalle und Vanadinpentoxyd

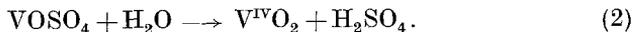


woraus die Summenformel  $M^I VO_3$  resultiert. Aus 2 Molekülen Metavanadat entstehen durch Reaktion mit konzentrierter Schwefelsäure Vanadinpentoxyd, Natriumsulfat und Wasser, wie Reaktionsgleichung 1 zeigt:



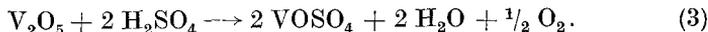
Das hierbei entstehende Vanadinpentoxyd ist je nach Molekulargröße orange-gelb bis ziegelrot gefärbt.

Das durch Reduktion gebildete Vanadylsulfat,  $V^{IV}OSO_4$ , kommt in 2 Modifikationen, nämlich der wasserlöslichen blauen und der wasserunlöslichen grau-grünen, vor. Letztere geht beim Erhitzen mit wenig Wasser bei 130° C in die wasserlösliche Form über. Bei längerem Stehen lassen wässrige Lösungen infolge Hydrolyse unlösliches *grünes* Vanadindioxyd ausfallen, wie Reaktionsgleichung 2 zeigt:

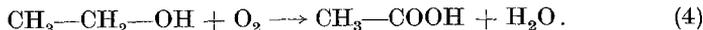


Bei der Herstellung von Vanadylsulfatlösungen muß demzufolge zur Vermeidung der Hydrolyse Schwefelsäure zugesetzt werden.

Wie Reaktionsgleichung 1 zeigt, wird aus 2 Molekülen Natriummetavanadat 1 Molekül Vanadinpentoxyd gebildet. Bei der weiteren Umsetzung mit Schwefelsäure bilden sich gemäß Reaktionsgleichung 3 aus 1 Molekül Vanadinpentoxyd 2 Moleküle Vanadylsulfat und neben 2 Molekülen Wasser  $\frac{1}{2}$  Molekül Sauerstoff:



Unter Zugrundelegung der Annahme, daß Äthylalkohol zu Essigsäure oxydiert wird, muß gemäß Reaktionsgleichung 4 ein *ganzes* Molekül Sauerstoff zugeführt werden:



Nach diesen Reaktionsgleichungen ergibt sich in der abschließenden Betrachtung, daß zur Oxydation eines Alkoholmoleküls 4 Moleküle Natriummetavanadat = 2 Moleküle Vanadinpentoxyd = 4 Moleküle Vanadylsulfat benötigt werden. Vanadin und Chrom zeigen gegenüber Äthylalkohol unterschiedliche Oxydationspotentiale und stehen im Verhältnis 1:3 zueinander, da bekanntlich Vanadin 1 Elektron, Chrom dagegen 3 Elektronen bei der Alkoholoxydation aufnimmt.

#### *B. Prüfung des optischen Verhaltens der verwendeten Reagentien.*

Wir studierten die Absorptionskurvenverläufe von Vanadin-Schwefelsäure (= Vanadinpentoxyd), Schwefelsäure und Vanadylsulfat. Alle Messungen wurden mit dem Spektralphotometer der Firma Zeiss-Opton und dem Monochromator M4 Q ausgeführt. Die Reagentien wurden gegen bidestilliertes Wasser in Quarzcuvetten bei einer Schichtdicke von 10 mm gemessen.

Vanadinschwefelsäure zeigt im sichtbaren Spektralbereich keine wesentlichen Merkmale bis zu einer Wellenlänge von 560 nm, von 550 nm an erfolgt ein stetiger Anstieg, der sich bis 360 nm verfolgen läßt. Schwefelsäure verhält sich in diesem Bereich im wesentlichen unauffällig. Vanadylsulfat hat dagegen ein Maximum bei 750 nm und ein ausgedehntes Minimum im Bereich von 490—410 nm; sodann läßt sich ein stetiger Anstieg bis 250 nm verfolgen. Eine Überdeckung oder Beeinflussung der Absorptionskurven liegt also nicht vor.

#### *C. Prüfung des Vanadylsulfats auf die Gültigkeit des BEERSchen Gesetzes.*

Wir prüften die Gültigkeit des BEERSchen Gesetzes an einer m/100 Vanadylsulfatlösung, in steigenden Vorlagen von 2—12 ml, entsprechend einem Gehalt von 3,26—19,56 mg. Diese Mengen entsprechen den Verhältnissen, wenn 2 ml Vanadinschwefelsäure im Überschuß vorgelegt werden. Die Messungen erfolgten im Elektrophotometer ELKO II“ der Firma Zeiss-Opton unter Verwendung des Filters S 57 und Cuvetten mit einer Schichtdicke von 10 mm. An Stelle des an sich besser ansprechenden Filters S 72 mußten wir aus technischen Gründen mit dem Filter S 57 vorlieb nehmen. Unsere Meßergebnisse, bei denen es sich ausschließlich um Mittelwerte aus je 10 Einzeluntersuchungen handelt, ließen bereits überschlagsmäßig den linearen Anstieg und somit die Gültigkeit des BEERSchen Gesetzes erkennen, so daß wir von einer weiteren Auswertung Abstand nahmen.

#### *D. Reaktionskinetische Untersuchungen.*

Bei diesen Untersuchungen verfahren wir folgendermaßen: 2 ml der nach den Angaben von VIDIC hergestellten Vanadinschwefelsäure (4,3 g

Natriummetavanadat mit 13 ml destilliertem Wasser auf dem Wasserbade erwärmt und mit 100 ml konzentrierter Schwefelsäure 1,84 versetzt) wurden in Widmark-Kolben gefüllt und diese sodann mit 0,2 ml Alkoholstandardlösung beschickt. Wir verwendeten Alkoholstandardlösungen entsprechend einem Gehalt von 1‰, 2‰ und 3‰ Alkohol. Als Reaktionstemperatur wählten wir, wie von VIDIC angegeben, 89° C und benutzten als Reaktionsraum einen Thermostaten, der etwa 1/2 Std vor Reaktionsbeginn auf diese Temperatur eingestellt worden war. Alle Proben wurden dann dieser Temperatur ausgesetzt und halbstündlich je 3 Werte je einer bestimmten Alkoholkonzentration herausgenommen.

Die Untersuchungsdauer erstreckte sich insgesamt über 5 Std. Anschließend wurden die abgekühlten Proben mit destilliertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 25 ml aufgefüllt und nach erneutem Abkühlen im Photometer bei einer Schichtdicke von 10 mm gemessen. Alle diese Ergebnisse sind als Mittelwerte graphisch in Abb. 1 dargestellt. Man sieht daraus, daß alle Werte zunächst rasch ansteigen und von der 3. Stunde an allmählich dem Endpunkt zustreben. Dieser

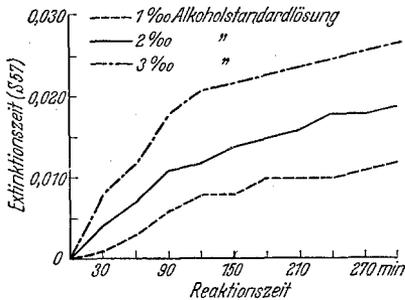


Abb. 1.

ist aber auch nach der 5. Stunde noch nicht vollständig erreicht. Da aber die Halbwertszeit etwa um die 4. Stunde anzunehmen ist, haben wir bei allen unseren weiteren Untersuchungen eine Reaktionszeit von 4 Std bei einer Temperatur von 89° C gewählt und diese Bedingungen genau eingehalten. Wir hatten somit die Gewißheit, daß der vorgelegte Alkohol auch wirklich annähernd vollständig überdestilliert und oxydiert und somit als Vanadylsulfat erfaßbar war.

Es soll in diesem Zusammenhange erwähnt werden, daß wir *nicht* wie VIDIC Filtrierpapierrollchen bei unseren Untersuchungen verwandten, sondern 0,2 ml alkoholhaltige Flüssigkeit, abgemessen in Präzisionsmikropipetten, unmittelbar in die Nöpfchen einfüllten. In Abb. 1 sind die Kurvenverläufe für 1-, 2- und 3‰ige Alkoholstandardlösungen dargestellt. Nach diesen Kurven ist die Halbwertszeit bei 4 Std anzunehmen.

#### E. Aufstellung einer Eichkurve.

Im weiteren Verlauf haben wir Alkoholstandardlösungen steigender Konzentrationen von 0,1–4,0‰ untersucht und eine Eichkurve aufgestellt. Alle Lösungen wurden 10fach bestimmt. Die Messungen erfolgten mit dem Photometer „ELKO II“ bei einer Cuvettenschichtdicke von 50 mm und dem Filter S 57. In Tabelle I sind die gemittelten

Extinktionswerte für jede Alkoholkonzentration und die zugehörige mittlere quadratische Abweichung  $\sigma$  für die Einzelmessung als Promille-Abweichung angegeben worden.

Man erkennt, daß bis zu Alkoholkonzentrationen von 3,5‰ eine geringe Streubreite bis maximal  $\pm 0,09\%$  besteht. Die größere Streuung des 4‰-Wertes dürfte auf einer zu geringen Vorlage an Vanadinschwefelsäure beruhen, da wir nämlich nach Vorlage von 3 ml Vanadinschwefelsäure in einer Versuchsreihe von 10 Einzelmessungen unter sonst gleichen Bedingungen einen mittleren Extinktionswert erzielten, der dem linearen Kurvenverlauf weit besser entsprach.

Bei der Untersuchung einer großen Zahl alkoholhaltiger Blute konnte KRIEGER in der Praxis dieses Streumaß bestätigen. Hierbei betrug die größte Streuung  $\pm 0,08\%$ .

Zur Ermittlung der Alkoholkonzentration schlägt VIDIC die Anwendung eines Faktors vor. Dieser Faktor „F“ ist der Quotient aus Alkohol-

gehalt in mg/ml und der hierfür ermittelten Lichtextinktion. Unter Zuhilfenahme der Extinktionswerte, die wir bei der Aufstellung der Eichkurve erhielten, bestimmten wir den Faktor F bei einer Schichtdicke von 50 mm und dem Filter S 57 zahlenmäßig zu 28,7.

Gewichtspromille errechnen sich nach folgenden Formeln:

$$a) \text{ für Serum } C^{\text{‰}} = \frac{F \cdot E}{1,03}$$

$$b) \text{ für Vollblut } C^{\text{‰}} = \frac{F \cdot E}{1,058}$$

„E“ ist die ermittelte Lichtextinktion einer unbekanntesten Alkoholprobe X. 1,03 und 1,058 sind die mittleren spezifischen Gewichte für Serum und Vollblut.

Neben dem Vorzug der schnellen und sicheren Berechnung einer Alkoholkonzentration hat die Anwendung dieses Faktors noch den Vorteil, daß die beim Ablesen aus einer Eichkurve auftretenden geringfügigen Ablesefehler vermieden werden.

#### F. Die Prüfung der Alkoholspezifität.

Zur Prüfung der Spezifität des Verfahrens haben wir die in der Praxis am häufigsten anfallenden organischen Verbindungen wie *Methanol*,

Tabelle 1.

Alkoholstandardlösung ‰	Extinktionswert gemittelt	Mittlere quadratische Abweichung $\sigma$	
		des Extinktionswertes	‰
0,1	0,003	$\pm 0,001$	$\pm 0,03$
0,3	0,011	$\pm 0,002$	$\pm 0,05$
0,5	0,019	$\pm 0,002$	$\pm 0,05$
1,0	0,036	$\pm 0,002$	$\pm 0,06$
1,5	0,052	$\pm 0,001$	$\pm 0,03$
2,0	0,069	$\pm 0,003$	$\pm 0,09$
2,5	0,081	$\pm 0,001$	$\pm 0,03$
3,0	0,110	$\pm 0,002$	$\pm 0,05$
3,5	0,123	$\pm 0,003$	$\pm 0,08$
4,0	0,135	$\pm 0,015$	$\pm 0,44$

*Propanol, Butanol, Aceton, Äther, Benzin, Petroläther* der Fraktionen 30—50° und 60—80°, *Benzol, Chloroform* und *Tetrachlorkohlenstoff* geprüft. In allen Fällen konnten wir uns von der Oxydation dieser Ver-

Tabelle 2.

Reduzierende Substanz	Standard- lösung	Gehalt	Extinktion (S 57)	Vorge- täuschter Alkohol- gehalt	
	‰	mg	gemittelt	‰	
Methanol . . .	1,0	0,2	0,014	0,40	
	2,0	0,4	0,030	0,85	
	3,0	0,6	0,047	1,34	
Äthanol . . .	1,0	0,2	0,035	1,00	
	2,0	0,4	0,070	2,00	
	3,0	0,6	0,105	3,00	
Propanol . . .	1,0	0,2	0,033	0,94	
	2,0	0,4	0,066	1,88	
	3,0	0,6	0,089	2,55	
Butanol. . . .	1,0	0,2	0,039	1,10	
	2,0	0,4	0,074	2,12	
	3,0	0,6	0,111	3,17	
Aceton . . . .	1,0	0,2	0,012	0,34	
	2,0	0,4	0,029	0,83	
	3,0	0,6	0,062	1,78	
Benzol . . . .	1,0	0,18	0,093	2,66	
	D 0,8786 <sup>20</sup> . .	2,0	0,35	0,105	3,00
	3,0	0,53	0,120	3,43	
Äther. . . . .	1,0	0,14	0,068	1,96	
	D 0,71925 <sup>15</sup> . .	2,0	0,28	0,105	3,01
	3,0	0,42	0,121	3,46	
Chloroform . .	1,0	0,3	0,051	1,46	
	D 1,49845 <sup>15</sup> . .	2,0	0,6	0,084	2,40
	3,0	0,9	0,088	2,52	
Petroläther . .	rein	131,0	0,076	2,16	
	(30—50°)				
	D 0,645—0,655 <sup>20</sup>				
Petroläther . .	rein	17,5	0,087	2,48	
	(60—80°)				
	D 0,66—0,68				
Benzin . . . .	rein	131,0	0,130	3,71	
	D 0,635—0,655 <sup>15</sup>				
	Tetrachlor- kohlenstoff	rein	319,7	0,026	0,74
D 1,5985 <sup>18</sup>					

bindungen durch Vanadin überzeugen. Eine *Alkoholspezifität* des vorliegenden Verfahrens besteht danach *nicht*.

Im einzelnen möchten wir zu diesen Untersuchungen bemerken, daß wir mit wäßrigen Standardlösungen arbeiteten, soweit diese Verbindungen wasserlöslich waren. Benzol, Äther und Chloroform wurden als volumenpromillige Lösungen in Petroläther 30—50° gelöst; wir füllten hier ebenfalls 0,2 ml in die Nöpfchen und zogen von den gemessenen

Extinktionswerten den mittleren Extinktionswert des Petroläthers ab. Petroläther, Benzin und Tetrachlorkohlenstoff wurden unmittelbar untersucht. Alle Meßergebnisse wurden als Mittelwerte aus je 10 Einzeluntersuchungen in Tabelle 2 eingetragen. Die Extinktionswerte wurden mit dem oben erwähnten Faktor „ $F$ “ multipliziert und auf diesem Wege die vorgetäuschte Alkoholkonzentration erhalten.

#### *Diskussion.*

Vanadin ist für photometrische Alkoholbestimmungen besser geeignet als Chrom, weil sich die beiden Vanadin-Oxydationsstufen im sichtbaren Spektralbereich weder überdecken noch beeinflussen. Da bei äquivalenten Alkohollösungen durch das geringere Oxydationspotential mehr Vanadylsulfat als Chrom-III-Sulfat gebildet wird, zeigt Vanadin gegenüber Chrom eine größere Empfindlichkeit bei photometrischen Verfahren. Hierfür spricht die geringe Streubreite, die wir im Maximum zu  $\pm 0,09\%$  für die Einzelbestimmung ermittelten.

Bei geeigneter Vorlage von Vanadin-Schwefelsäure werden gute Ergebnisse erzielt, wenn als Reaktionstemperatur  $89^{\circ}\text{C}$  und als Reaktionszeit 4 Std gewählt werden. Vorteilhaft ist die vom Widmark-Verfahren übernommene Vereinigung von Destillation und Oxydation des Alkohols in einem Arbeitsgang, ferner die Eliminierung des Vorlagefehlers, da die dem Alkohol im stöchiometrischen Verhältnis entsprechende Vanadylsulfatmenge *direkt* erfaßt wird. Ein Zeitgewinn, wie er von GRÜNER für das photometrische Widmark-Verfahren durch Fortfall der Jodometrie diskutiert wurde, konnte bei unseren Reihenuntersuchungen nicht festgestellt werden. Das sorgfältige Auffüllen der Proben auf ein bestimmtes Quantum mit destilliertem Wasser erfordert ebensoviel Zeit wie die Sorgfalt beim photoelektrischen Meßgang.

Bei allen Vorteilen, zu denen wir auch noch die einfache und sichere Promille-Ermittlung durch Anwendung eines empirischen Faktors „ $F$ “ zählen, haben wir uns nicht von der Alkoholspezifität des Verfahrens überzeugen können. Vielmehr haben wir gefunden, daß alle vom Widmark-Verfahren her bekannten störenden Substanzen aus der Reihe der organischen Lösungsmittel relevante Blutalkoholkonzentrationen vortäuschen können. Wenn auch Chrom und Vanadin unterschiedliche Oxydationspotentiale aufweisen, da Chrom in diesem Redox-System 3 Elektronen, Vanadin dagegen nur 1 Elektron aufnimmt, so sind gerade beim Vanadin katalytische Effekte nicht unwahrscheinlich.

Das Vidic-Verfahren kann auch dahingehend modifiziert werden, daß, wie beim Widmark-Verfahren, alkoholhaltige Proben eingewogen werden. Der Faktor „ $F$ “ läßt sich auch auf diesem Wege ermitteln. Wir fanden dabei Zahlenwerte, die sich von dem oben angegebenen nur geringfügig unterschieden.

Bei kritischer Betrachtung kamen wir zu der Auffassung, daß das Vidic-Verfahren für Alkoholbestimmungen durchaus geeignet ist. Wegen seiner Alkoholunspezifität wird man in forensischen Fällen nicht auf das alkoholspezifische ADH-Verfahren verzichten können.

#### *Zusammenfassung.*

Wir haben über das von VIDIC angegebene Alkoholbestimmungsverfahren mittels Vanadinsäure eine Reihe von Untersuchungen angestellt und gefunden, daß sich dieses Verfahren zur Bestimmung des Alkoholgehaltes recht gut eignet. Leider ist dieses Verfahren nicht spezifisch für Äthylalkohol.

#### **Literatur.**

ANDERSON, R. K.: Amer. J. Clin. Path. **6**, 85 (1942). Zit. nach CASIER. — CASIER, H., et A. L. DELAUNOIS: Micromethode spectrophotometrique pour la détermination de l'alcool. Arch. internat. Pharmacodynamie **81**, 392 (1950). — GIBSON, J. G., u. H. BLOTNER: J. of Biol. Chem. **126**, 55 (1928). Zit. nach CASIER. — GINGRAS, R., u. R. GAUDRY: Naval Med. **9**, 661 (1944). Zit. nach CASIER. — GOUBAU, R.: Bull. Acad. Rép. Méd. Belg. **5**, 196 (1939). Zit. nach CASIER. — GREENBERG, L. A. and F. W. KEATER: Quart. J. Alcohol **2**, 57 (1941). Zit. nach CASIER. — GRÜNER, O.: Ein photometrisches Verfahren zur Blutalkoholbestimmung. Naturwiss. **13**, 365 (1953). — Ein photometrisches Verfahren zur Blutalkoholbestimmung. Slg. Vergift.fälle, Arch. Toxikol. **14**, 362 (1953). — JETTER, W. W.: Modified Dichromate Method for Determination of Ethylalcohol in biologic Tissue. Amer. J. Clin. Path. **20**, 473 (1950). — KRIEGER, A.: Experimentelle Untersuchungen zum quantitativen Äthylalkoholnachweis im Blut mittels Vanadinoxidation nach VIDIC. Inaug.-Diss. Bonn 1955. — NEWMAN, H. W. u. Mitarb.: J. exp. Thérapie Pharmacol. **74**, 369 (1942). Zit. nach CASIER. — SHAPIRO, J.: An Adaption of the photoelectric Colorimeter to the Determination of Alcohol in Blood and Urine. Amer. J. Clin. Path., 12 techn. Suppl. **6**, 66 (1942). — VIDIC, E.: (1) Ein einfaches Verfahren zur Bestimmung des Alkoholgehaltes in Körperflüssigkeiten für klinische und forensische Zwecke. I. Mitt. Arzneimittel-Forsch. **4**, 411—418 (1954). — (2) Die Bestimmung des Alkohols in biologischen Flüssigkeiten mittels Vanadinsäure. 2. Mitt. Arzneimittel-Forsch. **4**, 506—507 (1954).

Prof. Dr. phil. W. PAULUS, Bonn a. Rh., Wilhelmsplatz 7.