

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Göttingen
(Direktor: Prof. Dr. L. LENDLE)

**Spezifischer Nachweis von Vergiftungen mit Alkylphosphaten
(E 600, E 605, Systox) in Blut und Hirngewebe
mit Hilfe eines fermentaktivierenden Antidots
(Pyridin-Aldoxim-Methjodid, PAM) *, ****

Von

K. D. FRIEDBERG und F. SAKAI ***

Mit 5 Textabbildungen

(Eingegangen am 3. März 1958)

Der Gerichtsmediziner mußte sich in den letzten Jahren oft mit Vergiftungen durch Schädlingsbekämpfungsmittel aus der Gruppe der organischen Phosphorsäureester — in erster Linie durch E 605 — beschäftigen. Diese Stoffe wurden für Selbstmordzwecke wegen ihrer leichten Erreichbarkeit, ihrem sicheren Wirkungserfolg und auch infolge entsprechender Sensationsmeldungen der Presse nach einem Mordfall bevorzugt verwendet. Andererseits sind gelegentlich, verursacht durch mangelhafte Schutzmaßnahmen bei der Herstellung und unsachgemäße Anwendung oder Aufbewahrung dieser hochgiftigen Stoffe auch gewerbliche und versehentliche Vergiftungen aufgetreten (s. unter anderem PRIBILLA 1955, REINL 1956). Obwohl die Tendenz besteht, die hochgiftigen Alkylphosphate durch insecticid ebenso wirksame, aber für den Warmblüter weniger toxische Verbindungen dieser Stoffgruppe zu ersetzen, spielt das E 605 unter den Kontaktinsecticiden immer noch eine dominierende Rolle (SCHRADER 1957). Daneben haben vor allen Dingen die ebenfalls sehr toxischen Stoffe der Systoxgruppe als sog. „systemische“ Insecticide in letzter Zeit an Bedeutung gewonnen.

Bei Vergiftungen mit den so viel benutzten Alkylphosphaten ist der eindeutige Nachweis des Giftes im biologischen Material, insbesondere in der Leiche, nach wie vor mit Schwierigkeiten und mit einer gewissen Unsicherheit belastet. Die Vielzahl von diesbezüglichen Veröffentlichungen, die wiederholt verbesserte Varianten der üblichen Methoden mitteilen, mag das vielleicht belegen.

* Herrn Prof. Dr. med. HANS JOACHIM DEUTICKE, Göttingen, zum 60. Geburtstag gewidmet.

** Auszugsweise vorgetragen auf der 23. Tagung der Deutschen Pharmakologischen Gesellschaft, Freiburg, 13.—15. Juni 1957.

*** Stipendiat der A. v. Humboldt-Stiftung.

Beim E 605 und auch beim E 600 ergibt sich durch die Kombination verschiedener analytischer Verfahren, die zum Nachweis letztlich den Nitrophenolanteil des Moleküls (AVERELL u. NORRIS 1948, SCHWERD u. SCHMIDT 1952, KAISER u. LANG 1953, PFEIL 1954, FRETZWURST u. NAEVE 1955, PAULUS u. MALLACH 1955, KAISER u. HAAG 1956), gelegentlich auch das UV-Absorptionsspektrum (DERKOSCH u. Mitarb. 1954, SCHMIDT 1955, MACHATA 1956, BURGER 1957) oder die Polarographie (BOWEN u. EDWARDS 1950, DEMNY-PONSERT 1955) benutzen, im allgemeinen eine ausreichende Sicherheit für die Diagnose, besonders wenn Mageninhalt zur Verfügung steht. In Blut und Organen wird der Wert der Bestimmungen skeptisch beurteilt.

Umfangreiche Untersuchungen von WEINIG u. Mitarb. (1955) haben gezeigt, daß dem Beweiswert der viel benutzten Reaktion von AVERELL u. NORRIS, auch in der Modifikation von KAISER u. LANG, nur eine beschränkte Bedeutung zukommt, da zahlreiche toxikologisch wichtige Stoffe eine positive Reaktion vortäuschen können. Auf diese Weise ist es nur möglich, mit Sicherheit eine E 605-Vergiftung auszuschließen, nicht aber sie absolut zu beweisen. Andererseits sind auch Fälle bekannt geworden, wo bei sicheren E 605-Vergiftungen der chemische Nachweis des Giftes nicht erbracht werden konnte. LUTZ (1957) stellte nochmal ausdrücklich fest, daß es bisher keine spezifische Erkennungsreaktion für E 605 gibt. Die Analysen für Systox und seine Verwandten sind bisher in gar keiner Weise befriedigend gelungen, und so entziehen sich diese Stoffe in der Leiche noch weitgehend einer einfachen chemischen Nachweismöglichkeit (SCHMIDT 1955, FISCHER u. SPECHT 1957). Es fehlt darum nicht an Versuchen, die chemischen Nachweisverfahren für diese Gifte durch biologische zu ersetzen. Dazu können zunächst einmal die insecticiden Eigenschaften der organischen Phosphorsäureester herangezogen werden. Im Mageninhalt nach oraler Vergiftung mit E 605 kann man z. B. mit Kornkäfern (VOGEL 1953, DOTZAUER und NAEVE 1955) verhältnismäßig einfach und über längere Zeit das unzersetzte Gift nachweisen; in Blut und Gewebe muß dagegen damit gerechnet werden, daß diese Methoden ebenso wie die chemischen Analysen versagen, da das E 605 im Organismus sehr schnell abgebaut wird (LEHMANN 1949, ENDERS 1955). Außerdem erfaßt man mit diesem Vorgehen natürlich eine große Vielzahl von insecticiden Stoffen, kann allerdings unter Umständen durch geeignete Extraktionsverfahren, durch papierchromatographische Trennung (GRUCH 1954) und durch den Absterbemodus gewisse Differenzierungen treffen.

Ein besserer Anhalt für eine Alkylphosphatvergiftung ist gewonnen, wenn im vergifteten Organismus eine deutliche Blockierung der Cholinesterasen, dem wahrscheinlichen Hauptangriffspunkt der organischen Phosphorsäureester, nachgewiesen werden kann; denn diese Fermente bleiben über einen mehr oder weniger großen Zeitraum auch nach Abbau des Hemmstoffes blockiert. Die Blockierung einer Cholinesterase kommt ja gerade in dem Augenblick zustande, in dem das Ferment die Phosphorsäureester hydrolysiert und mit dem einen Spaltprodukt eine relativ stabile Bindung eingeht.

Beim Menschen, bei Arbeitern, die mit E 605 umgehen und auch im Leichenmaterial, ist die Cholinesteraseaktivität hauptsächlich in Serum und Erythrocyten schon mehrfach untersucht und mit Normalwerten verglichen worden (BARNES u. DAVIES 1951). Eine eindeutige Beurteilung der Cholinesterasehemmung war in erster Linie dann möglich,

wenn man im Rahmen von Betriebskontrollen vor dem Kontakt mit Phosphorsäureester die individuellen Cholinesterasewerte bestimmt hatte (WIRTH 1954). Bei Messungen im Leichenmaterial ist man teilweise zu unbefriedigenden Ergebnissen gekommen (z. B. LEONHARDT 1953, BÖHMER 1954).

Erst vor kurzem hat PRIBILLA (1957) in dieser Zeitschrift eine ausführliche Übersicht über entsprechende Untersuchungen an der menschlichen Serumcholinesterase mit eigenen Befunden veröffentlicht; PRIBILLA beurteilt die diagnostischen Möglichkeiten auf Grund der Bestimmung der Serumcholinesteraseaktivität bei unklaren Todesfällen sehr vorsichtig. Erst eine umfangreiche Sammlung vieler bei letaler Vergiftung gewonnener Werte neben sorgfältiger statistischer Ermittlung des Normalbereichs gäbe dafür die wünschenswerte Grundlage. WIRTH (1956) hat vorgeschlagen, die Diagnose bei fraglichen E 605-Todesfällen durch Aktivitätsmessungen der Cholinesterasen in bestimmten Hirnabschnitten zu unterbauen. Er hat bei 8 Suiciden mit E 605 deutliche Senkungen der Fermentaktivität unter die normalen Verhältnisse gefunden.

Im folgenden haben wir eine Reihe von Gesichtspunkten zusammengestellt, die wahrscheinlich die allgemeine Einführung einfacher Cholinesterase-Aktivitätsbestimmungen zum Nachweis von Vergiftungen in der forensischen Praxis beschränken:

1. Die normale Aktivität der Cholinesterasen, besonders der Pseudocholinesterase im Serum, aber auch der echten Cholinesterase in Erythrocyten streut so erheblich, daß bei den meisten Untersuchern die höchsten gemessenen Werte annähernd doppelt so groß sind wie die kleinsten. In manchen Fällen ist die Streuung sogar noch größer (ANTEPOL u. Mitarb. 1938, HEIM 1944, CALLAVEY, DAVIES u. RUTLAND 1951, ALDRIDGE u. DAVIES 1952, HUTCHINSON u. WIDDOWSON 1952, WOLFSIE u. WINTER 1952, SLEISENGER u. Mitarb. 1953, VORHAUS u. KARK 1953, FLEISHER u. POPE 1954, MOLANDER u. Mitarb. 1954, WIRTH 1954, AMMON u. ZAPF 1955, HEINECKER u. LOSSE 1955, OKINAKA u. YOSHIKAWA 1955, KOMMERELL u. FRENKEN 1956, MAIER 1956, PRIBILLA 1957).

2. Viele der genannten Autoren beschreiben außerdem, daß bei verschiedenen Erkrankungen, besonders bei Schäden des Leberparenchyms, die Serum-Cholinesterase unter die Norm herabgedrückt, bei anderen Erkrankungen wieder erheblich gesteigert wird. Eine Übersicht dieser vielfältig komplizierten Verhältnisse hat SCHILF 1955 zusammengestellt.

3. Für alle Cholinesterasen gilt weiterhin, daß sie nicht nur durch organische Phosphorsäureester, sondern durch zahlreiche andere Pharmaka mehr oder weniger stark gehemmt werden. Am bekanntesten ist

diese Erscheinung für das Physostigmin und Prostigmin. Daneben werden unter anderem folgende Stoffe oder Stoffgruppen in der Literatur als Cholinesterasehemmer genannt: Farbstoffe, Vitamine (Vitamin B₁), Hormone, Lysergsäurederivate, Kresylphosphate, Narkotica und Hypnotica, Histamin, Antihistaminica, Morphin, Chinin, Ergotamin, Novocain, Stickstofflost, Natriumsalicylat, Muskelrelaxantien und Phentiazine. (Tabellarische Zusammenstellung bei AUGUSTINSSON 1948.)

4. Die Cholinesterasen überleben den Tod im Organismus im Gegensatz zu anderen Fermenten überraschend lange, was wir auch durch eigene Untersuchungen bestätigt haben (s. unten). Andererseits gelingt es nur in verhältnismäßig frischem Zustand aus der Leiche reines Serum oder intakte Erythrocyten zu gewinnen. Hat die Leiche erst etwas länger gelegen, so ist einerseits mit Hämolyse in verschieden starkem Ausmaß, andererseits mit einem unkontrollierbaren Austausch des Gewebewassers mit dem Serum zu rechnen, und der Bezug auf Normalwerte wird dadurch fragwürdig.

5. Schließlich ist für einen Teil der Phosphorsäureester die Hemmung der Cholinesterase *in vivo* (DU BOIS u. Mitarb. 1949, KEWITZ 1957), aber auch in der Leiche und *in vitro*, wie unten noch gezeigt werden soll, mehr oder weniger schnell wieder reversibel. PRIBILLA findet bei seinen 11 Vergiftungsfällen mit E 605, daß die Cholinesteraseaktivität im Serum dieser Leichen unter der 2 σ -Grenze des Normalbereiches liegen. Hätte er das Serum nur einige Tage aufbewahrt und dann noch einmal gemessen, so wäre vermutlich, zum mindesten in einem Teil der Fälle, der sichere Nachweis einer Cholinesterasehemmung nicht mehr zu erbringen gewesen. Ganz unzulässig ist es wohl, wie es gelegentlich von anderen Autoren versucht wurde, auf Grund von Cholinesterasehemmwerten im Gewebe Rückschlüsse zu ziehen auf die Giftkonzentration, die an der untersuchten Stelle eingewirkt hat.

6. Selbst wenn nun rechtzeitig aus der Leiche Material zur Cholinesterasebestimmung entnommen werden kann, ergibt sich für den Untersucher in der Praxis noch folgende Unbequemlichkeit. Es stehen heute zahlreiche Methoden zur Messung der Cholinesteraseaktivität zur Verfügung. (Übersichten bei STUMPF 1956, PRIBILLA 1957, ERDMANN u. LENDLE 1958). Für jeden Untersucher, der seine Diagnose bei Vergiftungsfällen auf Messungen der Cholinesteraseaktivität stützen will, ist es notwendig, daß er für die von ihm gewählte Methode unter seinen speziellen Arbeitsbedingungen an einem genügend großen Kollektiv Normalwerte bestimmt, um eine bindende Aussage machen zu können, in welcher Größenordnung von einer echten Cholinesterasehemmung gesprochen werden kann.

Vor einiger Zeit ist es nun NACHMANSOHN u. WILSON und ihren Mitarbeitern gelungen, durch systematische Forschungen spezifische

Reaktivatoren für durch Alkylphosphate blockierte Cholinesterasen aufzufinden (WILSON 1952, 1955; WILSON u. Mitarb. 1955). Als einer der wirksamsten Körper dieser Stoffgruppe hat sich das N-Methyl-

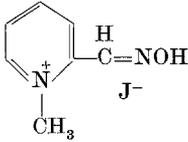


Abb. 1. N-Methyl-jodid des Pyridin-2-Aldoxims (PAM)

jodid des Pyridin-2-Aldoxims, abgekürzt PAM (Abb. 1), erwiesen, das pharmakologisch schon verschiedentlich geprüft wurde (in Deutschland z. B. von BETHE, ERDMANN u. Mitarb. 1957) und bereits auch als Antidot bei E 605-Vergiftungen beim Menschen Anwendung gefunden hat (HIRAKI u. NAMBA 1957). Unsere bisherigen Kenntnisse über den Mechanismus dieser Fermentreaktivierung wurden kürzlich in einer Übersicht von KEWITZ (1957) dargestellt.

In einem von NACHMAN-SOHN (1955) übernommenen Schema (Abb. 2) ist das Wesentliche noch einmal zusammengefaßt. Es besteht die Vorstellung, daß die Cholinesterasen zwei aktive Stellen besitzen, eine anionische und eine esteratische. An der anionischen Stelle werden normalerweise die Cholinester angelagert, um an der esteratischen Stelle unter Acetylierung des Fermentes gespalten zu werden. Der Acetatrest löst sich dann sofort von der esteratischen Stelle, und das Ferment ist wieder reaktionsfähig. Die organischen Phosphorsäureester werden nun in entsprechender Weise abgebaut; aber in diesem Fall bleibt der Alkylphosphatrest an der esteratischen Stelle gebunden, und damit

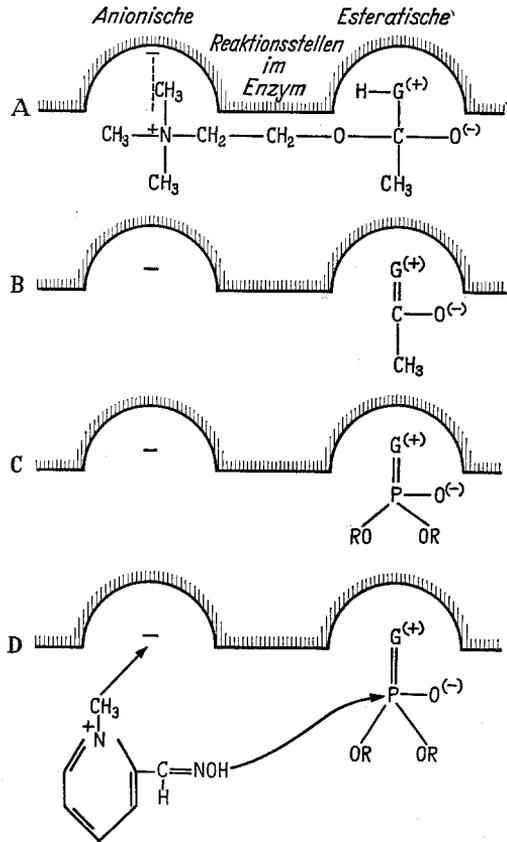


Abb. 2 A—D. Schematische Darstellung der Reaktionsstellen der Acetylcholinesterase [NACHMAN-SOHN, D.: *Ergebn. Physiol.* 48, 654, 657, 658 (1955)]. A Reaktion mit dem physiologischen Substrat Acetylcholin (Michaelis-Menten-Komplex); B unbeständige acetylierte Form der Esterase, die intermediär aus der Spaltung von Acetylcholin resultiert; C beständige alkylphosphorylierte Form der Esterase; D Wirkungsmodus eines Reaktivators (PAM). (Entnommen: KEWITZ, H.: *Klin. Wschr.* 1957, 522, Abb. 1 A—D)

ist das Ferment blockiert. Beim Hinzukommen des PAM, das mit seinem quarternären Stickstoff von der anionischen Stelle des Fermentes angezogen wird, kann die sog. nucleophile Gruppe der Verbindung, der durch Doppelbindung auf die esteratische Stelle gerichtete Oximrest, die Lösung des Alkylphosphates erreichen und damit das Ferment reaktivieren. Leider nimmt diese Reaktivierbarkeit mit der Dauer der Blockierung ständig ab. HOBBERGER (1955, 1956) hat diesen Vorgang genauer untersucht und glaubt ihn als eine „*Transphosphorylierung*“ deuten zu können. Er versteht darunter eine intramolekulare Umlagerung, bei der der Phosphatrest am Ferment verschoben wird, so daß dem Reaktivator kein Angriffspunkt mehr geboten ist. Diese Transphosphorylierung soll bei bestimmten Alkylphosphaten (besonders z. B. den Diisopropylphosphaten) begünstigt sein und wird auch durch Temperaturerhöhung auf 37° beschleunigt. DFP¹-vergiftetes Ferment läßt sich nur unmittelbar nach der Vergiftung, mit OMPA²-vergiftetes Ferment überhaupt nicht reaktivieren.

Im Zusammenhang dieser Arbeit muß betont werden, daß PAM und seine Verwandten die Blockierung der Cholinesterase durch andere Pharmaka, wie Physostigmin und Prostigmin, in gar keiner Weise beeinflussen, was uns auch eigene Kontrollversuche bestätigt haben.

Wir haben nun die Möglichkeit geprüft, ob mit Hilfe des PAM ein spezifisch biologischer Nachweis von Alkylphosphatvergiftungen möglich und für die praktische Anwendung sinnvoll ist.

Methodik

Zur Bestimmung der Cholinesteraseaktivität benutzen wir die manometrische Methode von AMMON (1934) mit der Warburgapparatur, etwas modifiziert. Als Substrat befindet sich im Hauptraum der Tröge 1,5 ml einer 0,5%igen Acetylcholinchloridlösung (Endkonzentration 0,375%) und in der Anhangbirne 0,5 ml des Fermentpräparates, das entweder aus 1:10 verdünntem Blut bzw. Serum oder Hirnhomogenat (1:33 verdünnt) besteht. Als Lösungsmittel und Verdünnungsflüssigkeit wurde eine Mischung aus 10 Teilen einer 0,9%igen NaCl-Lösung und 3 Teilen einer 1,26%igen NaHCO₃-Lösung verwandt. Auf die Zugabe von anderen Salzen wurde verzichtet, da es bei unseren Messungen nur auf Relativwerte ankam und nicht die optimale Fermentaktivität bestimmt werden mußte. Insofern ist es auch belanglos, daß das Substrat nicht genau im optimalen Konzentrationsbereich verwendet wurde. Vor Gebrauch wurde die Salzlösung mit einem Gemisch aus 5% CO₂ und 95%igen N₂ durch halbstündiges Durchperlen abgesättigt, und nach der Beschickung wurden die Manometer wie üblich mit diesem Gasgemisch durchströmt. Es wurde bei einer Temperatur von 37° gearbeitet, die Temperaturausgleichsperiode betrug 15 min, die Schüttelfrequenz 100/min. Dann wurde durch Kippen Ferment und Substrat vereinigt und sofort und alle 10 min eine Stunde lang abgelesen. Die Fermentpräparate wurden jeweils auf ihre Aktivität ohne und mit PAM getestet (im allgemeinen Dreifach- in einigen Fällen Doppelbestimmungen); der Reaktivator wurde beim Verdünnen des Fermentes zugesetzt; die Angaben der PAM-Konzentration beziehen sich auf die Konzentration in der Anhangbirne des Warburggefäßes; die Einwirkungszeit des PAM auf das Ferment betrug bis zum Beginn der Messung jeweils 1 Std.

¹ DFP = Diisopropylfluorophosphat.

² OMPA = Octamethylpyrophosphorsäureamid.

In Abb. 3 ist als Beispiel der Verlauf eines Versuches an Hirnhomogenat eines normalen und eines vergifteten Meerschweinchens dargestellt. Die lineare Charakteristik der Messungen erlaubte es uns

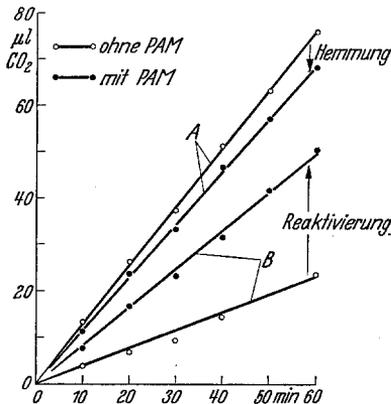


Abb. 3. Beispiel eines Versuches: Wirkung von PAM (10^{-3}) auf die Cholinesterase in Hirnhomogenat eines normalen (A) und eines mit E 605 vergifteten Meerschweinchens (B)

später, nur noch 2mal nach 30 und 60 min abzulesen und die Aktivitätsangaben in $\mu\text{l CO}_2/\text{Std}$ zu machen; bezogen ist dieser Wert auf die pro Trog eingesetzte Menge des jeweiligen Untersuchungsgutes — 50 mg Blut oder 15 mg Hirngewebe. Die Versuche wurden mit den folgenden 3 Alkylphosphaten durchgeführt:

O,O-Diäthyl-O-p-nitrophenylphosphat = Paroxon = E 600,

O,O-Diäthyl-O-p-nitrophenylthiophosphat = Parathion = E 605,

Diäthylthionophosphorsäureester des m- β -Oxyäthylthioäthyläthers = Systox.

Ergebnisse

Zunächst wurde bestimmt, in wie hoher Konzentration das PAM praktisch angewandt werden kann. Einerseits sollte eine möglichst deutliche Reaktivierung erzielt werden, auf der anderen Seite die Eigenwirkung des PAM, das in hoher Konzentration selbst eine Hemmung der Cholinesterase bewirkt, in einer annehmbaren Grenze bleiben. Wir konnten uns zunächst davon überzeugen, daß die Cholinesterase des Pferdeserums selbst bei einer starken Alkylphosphatvergiftung (Übervergiftung) *in vitro* — E 600: 3×10^{-5} und 3×10^{-6} , Systox: 10^{-5} und 10^{-6} , Konzentrationen, die *in vivo* in Blut und Gewebe praktisch nicht erreicht werden — durch PAM in einer für den Nachweis ausreichenden Weise reaktiviert werden kann, wenn man das PAM in der Verdünnung von 1:1000 im Ansatz anwendet, während bei geringeren Konzentrationen die Reaktivierung unter Umständen nicht mehr deutlich wird.

Bei der verhältnismäßig hohen AcetylcholinKonzentration, die wir bei unserer Methode benutzen, bleibt die *Eigenwirkung des PAM* auch in der angewandten hohen Konzentration (10^{-3}) gering. An verschiedenen Fermentpräparaten (Pferdeserum, Meerschweinchenblut, Meerschweinchenerythrocyten, Meerschweinchenplasma, Meerschweinchengesamtgehirn, Meerschweinchenkleinhirn und Katzenhirn) haben wir wiederholt diese Eigenwirkung bestimmt. Aus den gemessenen Werten, ohne und mit PAM, die absolut, je nach verwendetem Material, sehr

verschieden hoch waren, haben wir den Quotienten der Aktivitäten als „Index der Reaktivierbarkeit“ (IR): $\frac{\text{Aktivität ohne PAM}}{\text{Aktivität mit PAM}}$ gebildet, der sich für unsere Nachweismethode als praktisch erwiesen hat. Bei Einwirkung des Reaktivators auf unvergiftetes Ferment ist der Quotient größer als 1, bei vergiftetem Ferment, das durch PAM reaktiviert wird, kleiner als 1. Im Mittel betrug dieser Quotient an 20 unvergifteten Fermentpräparaten tierischer Herkunft: 1,21. Das entspricht einer durchschnittlichen Hemmung durch PAM von 17,5% als Eigenwirkung.

Interessant war nun die Frage, wie lange eine Reaktivierung der blockierten Fermente durch PAM und damit der Nachweis einer Alkylphosphatvergiftung möglich ist. Zunächst wurde in einigen Versuchsreihen *in vitro* Pferdeserum mit E 600 und Systox vergiftet und verschiedene Zeiten nach Aufbewahrung im Kühlschrank und bei Zimmertemperatur die Cholinesteraseaktivität mit und ohne PAM-Zusatz gemessen. Reines E 605 ist für diese *in vitro*-Versuche nicht so geeignet, da es erst

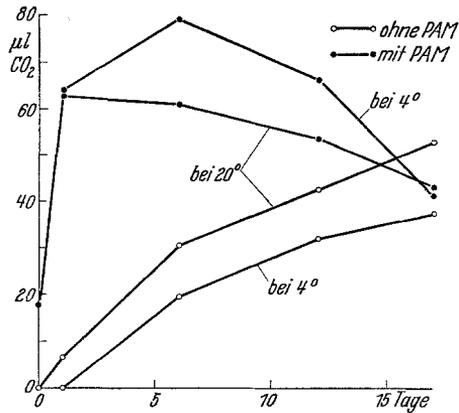


Abb. 4. Pferdeserum, vergiftet mit E 600 (10^{-6}). Cholinesteraseaktivität mit und ohne PAM (10^{-3}), verschiedene Zeiten nach der Vergiftung bei Aufbewahrung im Kühlschrank bei Zimmertemperatur

im Organismus eventuell durch eine „Konvertierung“ in Paroxon seine starke Anticholinesteraseeigenschaft erwirbt. Um auch für E 605 diese zeitlichen Verhältnisse zu untersuchen, wurde der Versuchsansatz so durchgeführt, daß Meerschweinchen mit dem Alkylphosphat vergiftet wurden und das entnommene Blut sofort und nach verschiedenen Zeiten, wieder vergleichend nach Aufbewahrung im Kühlschrank und im Zimmer auf seine Cholinesteraseaktivität mit und ohne Reaktivator geprüft wurde.

In einer Versuchsreihe mit E 600, die hier als Beispiel in Abb. 4 dargestellt ist, sind sowohl bei Zimmertemperatur als auch im Kühlschrank 2 Vorgänge zu beobachten, die die Nachweismöglichkeit der Vergiftung mit PAM begrenzen. Zunächst beobachtet man, daß mit Dauer der Vergiftung die Reaktivierbarkeit durch PAM abnimmt, was vielleicht auf die oben besprochene Transphosphorylierung des Fermentes nach HOBBIER zurückgeführt werden kann. Zweitens kommt es aber im Laufe der Zeit zu einer zunehmenden spontanen Reaktivierung des Fermentes, einer Erscheinung, die *in vivo* schon häufiger beschrieben

wurde (DU BOIS 1949, KEWITZ 1957), und ein Beweis mehr dafür, daß nicht bei allen Alkylphosphaten von irreversibler Hemmung der Cholinesterasen gesprochen werden darf. In der dargestellten Versuchsreihe bei Zimmertemperatur verursachen die beiden Vorgänge spontaner Reaktivierung und verminderter Reaktivierbarkeit, daß nach einem halben Monat die Reaktivierung des Fermentes durch PAM in eine Hemmung umschlägt, während zu diesem Zeitpunkt das in der Kälte aufbewahrte Ferment gerade noch in geringem Umfang reaktivierbar bleibt. Für E 605 wurde eine ähnliche Versuchsreihe erhalten. Dagegen zeigt sich

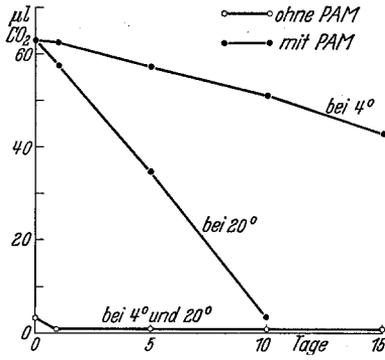


Abb. 5. Pferdeserum, vergiftet mit Systox (10^{-3}). Cholinesteraseaktivität mit und ohne PAM (10^{-3}), verschiedene Zeiten nach der Vergiftung bei Aufbewahrung im Kühlschrank und bei Zimmertemperatur

bei einer Vergiftung des Pferdeserums mit Systox (Abb. 5) ein etwas anderes Bild. Die spontane Reaktivierung fehlt, aber die Abnahme der Reaktivierbarkeit mit der Zeit ist auch hier besonders bei Aufbewahrung des Ansatzes bei Zimmertemperatur sehr deutlich.

Wir halten es für möglich, daß auf Grund solcher Verschiedenheiten unter Umständen durch mehrere in zeitlichen Abstand aufeinanderfolgende Messungen auch eine Differenzierung zwischen verschiedenen Alkylphosphaten erreicht werden kann.

Um uns den Verhältnissen, wie sie in der gerichtsmedizinischen Praxis vorliegen, etwas mehr anzupassen, sind wir im weiteren dazu übergegangen, *Untersuchungen an Kadavern von Tieren*, hauptsächlich Meer-schweinchen, durchzuführen, die im Rahmen anderer Fragestellungen mit Alkylphosphaten akut vergiftet worden waren. Blutgerinnsel aus dem Herzen und Kleinhirn, in dem die normale Aktivität bedeutend höher liegt als im Gesamthirn (s. auch WIRTH 1956), wurden nach verschiedener Lagerungszeit im Kühlschrank oder bei Zimmertemperatur aus den Tierleichen entnommen, homogenisiert, und die Cholinesteraseaktivität dieser Präparate mit und ohne PAM bestimmt.

In Tabelle 1 sind die erhaltenen Werte für E 600, in Tabelle 2 für E 605 und in Tabelle 3 für Systox dargestellt. Neben den gefundenen Absolutwerten ist aus Gründen der Übersichtlichkeit wieder der Quotient aus Aktivitäten ohne und mit PAM als „Index der Reaktivierbarkeit“ (IR) angewandt. Je kleiner er ist, um so stärker war die Reaktivierung. Wie aus den Tabellen ersichtlich war es uns möglich, auch nach mehrtägiger Lagerung den eindeutigen Beweis für vorliegende Alkylphosphatvergiftungen zu erbringen; nur in 2 Fällen fiel nach längerer

Tabelle 1. *Meerschweinchen, vergiftet mit E 600*

Cholinesterasewerte mit und ohne PAM in Blut und Kleinhirn, verschiedene Zeiten nach dem Tode dem Tierkadaver entnommen.

Dosis in mg/kg	Über- lebenszeit	Aufbewahrung des Kadavers	Unter- suchungs- gut	Cholinesterase- aktivität		IR
				ohne PAM	mit PAM	
E 600 0,5 i.v.	180 min getötet	2 Std im Kühlschrank	Blut	1,3	20,8	0,06
E 600 5,0 i.p.	150 min getötet	3 Std im Kühlschrank	Blut	4,1	53,5	0,08
E 600 0,3 i.v.	300 min getötet	1 Tag im Kühlschrank	Blut	35,5	65,4	0,54
E 600 1,1 i.v.	135 min getötet	1 Tag im Kühlschrank	Blut Kleinhirn	6,2 28,2	46,1 49,8	0,13 0,57
E 600 5,0 i.p.	85 min	5 Tage im Kühlschrank	Kleinhirn	23,6	50,5	0,47
E 600 10,0 i.p.	95 min	10 Tage im Kühlschrank	Blut Kleinhirn	14,5 40,6	18,4 47,4	0,79 0,86
E 600 5,0 i.p.	360 min	8 Tage im Zimmer	Blut Kleinhirn	20,8 71,2	28,2 57,8	0,74 1,23

$$IR = \text{„Index der Reaktivierbarkeit“} = \text{Quotient: } \frac{\text{ChE-Aktivität ohne PAM}}{\text{ChE-Aktivität mit PAM}}$$

Tabelle 2. *Meerschweinchen, vergiftet mit E 605*

Cholinesterasewerte mit und ohne PAM in Blut und Kleinhirn, verschiedene Zeiten nach dem Tode dem Tierkadaver entnommen.

Dosis in mg/kg	Über- lebenszeit	Aufbewahrung des Kadavers	Unter- suchungs- gut	Cholinesterase- aktivität		IR
				ohne PAM	mit PAM	
E 605 12,7 i.v.	90 min	1 Tag im Kühlschrank	Blut	19,9	59,4	0,34
E 605 10,0 i.p.	20 min	10 Tage im Kühlschrank	Blut Kleinhirn	39,1 39,8	54,4 40,4	0,71 0,98
E 605 10,0 i.p.	70 min	1 Tag im Zimmer	Blut Kleinhirn	13,6 7,6	54,9 33,3	0,25 0,23
E 605 2 x 10,0 s.c.	2 Tage	2 Tage im Zimmer	Kleinhirn	11,8	26,3	0,45
E 605 20,0 i.p.	280 min	3 Tage im Zimmer	Blut Kleinhirn	34,2 12,0	57,8 36,2	0,59 0,33
E 605 10,0 i.p.	175 min	6 Tage im Zimmer	Blut Kleinhirn	6,6 5,4	7,6 29,2	0,87 0,19
E 605 10,0 i.p.	180 min	7 Tage im Zimmer	Kleinhirn	79,6	61,3	1,3

$$IR = \text{„Index der Reaktivierbarkeit“} = \text{Quotient: } \frac{\text{ChE-Aktivität ohne PAM}}{\text{ChE-Aktivität mit PAM}}$$

Tabelle 3. *Meerschweinchen, vergiftet mit Systox*

Cholinesterasewerte mit und ohne PAM in Blut und Kleinhirn, verschiedene Zeiten nach dem Tode dem Tierkadaver entnommen.

Dosis in mg/kg	Über- lebenszeit	Aufbewahrung des Kadavers	Unter- suchungs- gut	Cholinesterase- aktivität		IR
				ohne PAM	mit PAM	
Systox 5,0 i.p.	90 min getötet	2 Std im Kühlschrank	Blut	0,9	57,2	0,02
Systox 50,0 i.p.	30 min getötet	1 Tag im Kühlschrank	Blut	1,3	31,7	0,03
			Kleinhirn	2,6	70,7	0,04
Systox 5,0 i.p.	95 min getötet	10 Tage im Kühlschrank	Blut	8,8	33,2	0,27
Systox 10,0 i.p.	95 min	10 Tage im Kühlschrank	Blut	1,7	43,7	0,04
			Kleinhirn	5,4	33,6	0,16
Systox 10,0 i.p.	30 min	1 Tag im Zimmer	Blut	1,6	41,9	0,04
			Kleinhirn	0,0	40,5	0,0
Systox 10,0 i.p.	85 min	3 Tage im Zimmer	Blut	0,7	29,5	0,02
			Kleinhirn	0,6	31,0	0,02
Systox 10,0 s.c.	225 min	5 Tage im Zimmer	Kleinhirn	0,6	26,2	0,02
Systox 10,0 i.p.	210 min	6 Tage im Zimmer	Blut	2,3	11,2	0,23
			Kleinhirn	0,6	21,7	0,03

IR = „Index der Reaktivierbarkeit = Quotient: $\frac{\text{ChE-Aktivität ohne PAM}}{\text{ChE-Aktivität mit PAM}}$

Aufbewahrung des Kadavers im Zimmer der Test im Kleinhirn negativ aus (IR > 1). Dagegen konnte noch nach 10tägiger Aufbewahrung der Kadaver im Kühlschrank der sichere Beweis für die Vergiftung erbracht werden. Bei den E 600- und E 605-Vergiftungen kommt offenbar wieder wie in den *in vitro*-Versuchen der spontanen Reaktivierung der blockierten Cholinesterase eine Bedeutung im Hinblick auf eine zeitliche Begrenzung des Giftnachweises zu, während bei den Systox-Vergiftungen ebenfalls in Parallele zu den Versuchen am Pferdeserum diese Erscheinung keine Rolle gespielt hat.

Nachdem von HIRAKI u. NAMBA (1957) auf Grund ihrer Erfahrungen beim Menschen eine PAM-Behandlung bei Vergiftungsfällen empfohlen wurde, haben wir im weiteren Verlauf unserer Untersuchungen noch die Frage geprüft, ob nach einer vorausgegangenen Therapie mit PAM bei Vergiftungen ein Nachweis in der hier angegebenen Weise möglich ist. An 5 Versuchstieren, die mit E 605 oder E 600 und zusätzlich mit PAM behandelt worden waren, wurde die Cholinesteraseaktivität mit und ohne PAM-Zusatz geprüft (Tabelle 4). Während in diesen Fällen im Blut der Nachweis der Alkylphosphatvergiftung unsicher wurde, konnte im Kleinhirn jedesmal eine Aktivitätssteigerung der Cholin-

Tabelle 4. *Tiere mit Alkylphosphat vergiftet und mit PAM in vivo behandelt*
 Cholinesterasewerte im Kleinhirn mit und ohne PAM (10^{-3}) in vitro.

Tier	Gift-Dosis in mg/kg	PAM- Gaben in mg/kg	Über- lebens- zeit	Aufbewahrung des Kadavers	Cholinesterase- aktivität		IR
					ohne PAM	mit PAM	
Katze	E 605 12,0 i.v.	$2 \times 30,0$ i.v.	5 Std	1 Tag im Kühlschrank	46,8	116,3	0,40
Katze	E 605 12,0 i.v.	$2 \times 30,0$ i.v.	2 Std	3 Tage im Kühlschrank	0,0	57,3	0,0
Katze	E 605 12,0 i.v.	$2 \times 30,0$ i.v. $1 \times 20,0$ intra- cisternal	2 Std	1 Std im Zimmer	115,0	161,0	0,71
Ratte	E 605 0,2 i.v.	$1 \times 30,0$ i.v.	4 Std	1 Tag im Kühlschrank	7,2	45,1	0,16
Meer- schwein- chen	E 600 $7 \times 0,3$ i.p. an 7 auf- einander- folgenden Tagen	$1 \times 30,0$ i.v. am 8.Tag	8 Tage	1 Std im Zimmer	68,0	78,0	0,87

$$\text{IR} = \text{„Index der Reaktivierbarkeit“} = \text{Quotient: } \frac{\text{ChE-Aktivität ohne PAM}}{\text{ChE-Aktivität mit PAM}}$$

esterase durch PAM erzielt und damit der eindeutige Vergiftungsnachweis erbracht werden. Dieses Resultat hatten wir erwartet, da das PAM als gut wasserlösliche quaternäre Ammoniumbase nur sehr schlecht durch die Blut-Hirnschranke permeiert (KEWITZ 1957, SAKAI u. Mitarb. 1958). Im dritten Katzenversuch wurde sogar PAM in den Liquor appliziert, aber auch hier war später in vitro noch eine Aktivierung der Kleinhirnocholinesterase möglich.

Schließlich wurden auch noch einige Versuche an protrahiert vergifteten Tieren durchgeführt. Vier Meerschweinchen erhielten täglich subletale Dosen von E 600, um dann einen Tag nach der letzten Alkylphosphatgabe getötet zu werden. Es konnte gezeigt werden, daß auch unter diesen Umständen trotz einer sehr viel stärker ins Gewicht fallenden Transphorylierung der Fermente ein Nachweis der Phosphorsäureester einwirkung auf den Organismus möglich sein kann (Tabelle 5). Nur bei dem letzten Tier mit der kleinsten täglichen Dosis und der längsten Applikationszeit erreicht der „Index der Reaktivierbarkeit“ im Kleinhirn den Wert von 1,01; dagegen ist im Blut auch in diesem Fall der Nachweis noch eindeutig.

Durch die Freundlichkeit von Herrn Professor SCHMIDT und seiner Assistenten, Herrn Dr. LÖRKE und Herrn Dr. STARCK vom Gerichts-

Tabelle 5. *Meerschweinchen, protrahiert mit E 600 — vergiftet durch intraperitoneale Injektion an aufeinanderfolgenden Tagen*
Cholinesterasewerte mit und ohne PAM (10^{-3}) in Blut und Kleinhirn.

Dosis in mg/kg	Über- lebenszeit nach der ersten Dosis	Aufbewahrung des Kadavers	Unter- suchungs- gut	Cholinesterase- aktivität		IR
				ohne PAM	mit PAM	
E 600 4 × 0,4	5 Tage getötet	24 Std im Kühlschrank	Blut	22,4	41,5	0,54
			Kleinhirn	55,8	69,2	0,81
E 600 6 × 0,3	7 Tage getötet	24 Std im Kühlschrank	Blut	28,4	34,3	0,83
			Kleinhirn	46,7	68,1	0,69
E 600 8 × 0,2	9 Tage getötet	24 Std im Kühlschrank	Blut	22,3	33,9	0,66
			Kleinhirn	52,8	82,8	0,64
E 600 12 × 0,13	13 Tage getötet	24 Std im Kühlschrank	Blut	34,8	60,2	0,58
			Kleinhirn	97,4	96,2	1,01

$$IR = \text{„Index der Reaktivierbarkeit“} = \text{Quotient: } \frac{\text{ChE-Aktivität ohne PAM}}{\text{ChE-Aktivität mit PAM}}$$

medizinischen Institut der Universität Göttingen, denen wir an dieser Stelle noch einmal ganz besonders danken möchten, war es uns auch möglich, an *Blut und Hirngewebe von vergifteten Menschen* die Brauchbarkeit unserer Nachweismethode zu bestätigen.

In Tabelle 6 sind 21 Untersuchungen an 12 Todesfällen zusammengestellt. Es handelt sich um 7 Suicidfälle mit E 605 und um 5 Fälle mit anderen Todesursachen. Aus der Tabelle ist sehr gut ablesbar, daß mit wachsendem zeitlichen Abstand zwischen Tod und Untersuchung der „Index der Reaktivierbarkeit“ (Quotient: $\frac{\text{Cholinesteraseaktivität ohne PAM}}{\text{Cholinesteraseaktivität mit PAM}}$) ansteigt.

Untersuchung 9 und 10 haben auch bei deutlicher Fäulnis des zur Verfügung stehenden Blutes (28 und 48 Tage nach dem Tode) noch einen eindeutigen Nachweis der Alkylphosphatvergiftung erbracht. In Fall 5/57 hat die chemische Analyse des Mageninhalts ein sehr fragliches Ergebnis geliefert. Die Reaktivierung der Cholinesterasen im Blut, zwar nur gering infolge längerer Lagerung, reichte aus, die Diagnose zu sichern. Untersuchung 11 und 12 sind Wiederholungsbestimmungen von Vergiftungsfällen, für die anhand einer starken Reaktivierung durch PAM bereits früher (Untersuchung 8 und 1) der positive Vergiftungsnachweis geführt worden war. Inzwischen waren durch die längere Aufbewahrung des Untersuchungsgutes spontane Reaktivierung und verminderte Reaktivierbarkeit (Transphorylierung) soweit fortgeschritten, daß nun am Ferment die Wirkung des PAM in eine Hemmung umgeschlagen war. Die besonders hohe Cholinesteraseaktivität im Fall 9/57 (Untersuchung 12) verglichen mit den anderen E 605-Vergiftungen zeigt, wie stark sich die spontane Reaktivierung auswirken

Tabelle 6. *Cholinesteraseaktivität in Leichenmaterial*
 Blut und Serum 1:10, Hirnhomogenat 1:33 verdünnt, 21 Untersuchungen an
 12 Fällen nach Lagerungszeit geordnet.

Nr.	Todesfall	Untersuchungsgut	Zeitraum zwischen Tod und Unter- suchung	Cholinesterase- aktivität		IR
				ohne PAM	mit PAM	
Ia						
1	1/57	Blut	1 Tag	18	104	0,17
2	2/57	Großhirnrinde	1 Tag	1	16	0,07
3	2/57	Blut	1 Tag	43	157	0,27
4	6/57	Kleinhirnrinde	2 Tage	20	44	0,44
5	6/57	Blut	2 Tage	44	103	0,43
6	7/57	Blut	6 Tage	39	69	0,57
7	2/57	Cap. nucl. caud.	8 Tage	53	105	0,50
8	11/57	Blut	9 Tage	50	75	0,67
9	5/57	Blut*	28 Tage	75	85	0,88
10	2/57	Blut*	48 Tage	102	116	0,88
Ib						
11	11/57	Blut*	20 Tage	93	78	1,19
12	9/57	Blut*	27 Tage	168	140	1,20
13	1/57	Blut*	54 Tage	48	42	1,14
II						
14	3/57	Kleinhirnrinde	1 Tag	114	94	1,21
15	3/57	Blut	1 Tag	132	117	1,13
16	4/57	Kleinhirnrinde	3 Tage	106	87	1,22
17	4/57	Blut	3 Tage	186	154	1,21
18	10/57	Kleinhirnrinde	10 Tage	102	87	1,17
19	10/57	Blut	10 Tage	156	148	1,05
20	12/57	Serum	17 Tage	159	143	1,11
21	8/57	Blut**	33 Tage	29	27	1,07

Ia. Todesfälle, verursacht durch E 605. a) Eindeutiger Nachweis der Vergiftung durch Reaktivierung der Cholinesteraseaktivität mit PAM. IR = „Index der Reaktivierbarkeit“ $\left(\text{Quotient: } \frac{\text{Aktivität ohne PAM}}{\text{Aktivität mit PAM}} < 1,00. \right.$

Ib. Nachweis der Vergiftung durch Reaktivierung der Cholinesteraseaktivität mit PAM nicht mehr möglich, infolge zu langer Lagerung. Von den 3 Untersuchungen 2 Wiederholungsuntersuchungen von Fällen, die unter Ia eindeutig positiv waren.

II. Andere Todesfälle, Hemmung der Cholinesteraseaktivität durch PAM. IR = „Index der Reaktivierbarkeit“ $\left(\text{Quotient: } \frac{\text{Aktivität ohne PAM}}{\text{Aktivität mit PAM}} > 1,00. \right.$

* In diesen Fällen fiel eine deutliche Fäulnis des zu untersuchenden Blutes auf. (** Besonders starke Fäulnis).

kann, die möglicherweise hier durch eine Beimischung von etwas Leberbrei zu dem eingesandten Blut begünstigt worden ist.

Die Todesfälle mit anderer Ursache zeigen wieder das gewohnte Bild, nämlich nur eine geringe Aktivitätsverminderung der Cholinesterasen durch PAM. IR ist größer als 1 und bewegt sich in der gleichen Größe wie der erhaltene Mittelwert aus Versuchen an unvergifteten

tierischen Cholinesterasen. Daß im faulenden Blut auch ohne Phosphorsäureestervergiftung starke Aktivitätsverminderungen, aber ohne Reaktivierbarkeit vorkommen können, ist am Fall 8/57 (Untersuchung 21) demonstriert.

Diskussion

Wir glauben durch die vorgelegten Untersuchungen gezeigt zu haben, daß die vorgeschlagene Methode der Prüfung der Cholinesteraseaktivität in Blut und Kleinhirn mit und ohne Pyridin-Aldoxim-Methjodid (PAM) als relativ einfaches Verfahren für den Nachweis einer Alkylphosphatvergiftung in der gerichtsmedizinischen Praxis brauchbar ist. Quantitative Cholinesteraseaktivitätsbestimmungen sind heute praktisch ohne große Umstände in jedem Labor durchführbar (s. z. B. AMMON u. ZAPF 1955). Da bei unserer Nachweismethode kein Bezug auf die Normwerte der Cholinesteraseaktivität benötigt wird, entfällt es, eine umfangreiche Sammlung von Cholinesterasewerten in der Leiche mit statistischer Auswertung durchzuführen.

Mit einer beliebigen Methode wird die Wirkung von PAM auf ein Ferment geprüft; ergibt sich eine Fermentaktivitätssteigerung, so liegt mit Sicherheit eine Vergiftung mit einem organischen Phosphorsäureester vor. Der absolute Ausschluß einer derartigen Vergiftung ist mit der angegebenen Methode allerdings nicht zu erzielen, obwohl eine Hemmung durch PAM an frischen Präparaten von akuten Vergiftungen mit großer Wahrscheinlichkeit gegen Alkylphosphat als Ursache spricht.

Unter ungünstigen Umständen, bei längerer Lagerungszeit der Leiche oder des Untersuchungsgutes besonders in der Wärme oder bei einem Fall mit einem sehr verzögerten Vergiftungsverlauf, wie er in der Gerichtsmedizin allerdings selten zur Beurteilung vorgelegt wird, muß zweifellos damit gerechnet werden, daß gelegentlich an den verschiedenen Cholinesterasen keine Reaktivierung durch PAM mehr nachweisbar ist; spontane Reaktivierung und Verminderung der Reaktivität sind zu weit fortgeschritten.

Bei der Systoxvergiftung, die wir bisher nur an Tierkadavern untersuchen konnten, spielt auf Grund unserer Erfahrungen die spontane Reaktivierung gar keine oder zumindest eine sehr untergeordnete Rolle, so daß hier der angegebene Nachweis noch länger möglich sein dürfte, als bei E 600- und bei E 605-Vergiftungen.

In diesem Zusammenhang wäre auch noch darauf hinzuweisen, daß, solange unzerstörtes Gift im Organismus vorhanden ist, — im Mageninhalt von Vergifteten werden die organischen Phosphorsäureester im allgemeinen nur langsam zersetzt —, stets noch folgende sichere Nachweismöglichkeit mit Hilfe von PAM besteht. Extrakte entsprechender Asservate können an einem beliebigen Cholinesterasepräparat (z. B. Menschen- oder Pferdeserum) getestet werden. Eine Fermenthemmung,

die durch PAM reversibel beeinflusst werden kann, spricht dann einwandfrei für die Anwesenheit von Alkylphosphat und schützt den Untersucher, unspezifische Effekte positiv zu bewerten. Die gleiche Methode kann sinngemäß angewendet werden, wenn organische Phosphorsäureester sonst irgendwo identifiziert werden müssen, z. B. auf verdächtigem Obst oder Gemüse.

Zusammenfassung

Es wurde eine *einfache, spezifische, biologische Nachweismöglichkeit* für Alkylphosphatvergiftungen (E 600, E 605, Systox) mit Hilfe eines fermentreaktivierenden Antidots Pyridin-Aldoxim-Methjodid (PAM) angegeben.

Im einzelnen wurde festgestellt:

1. In einer Verdünnung 1:1000 reaktiviert PAM Cholinesterasen, die mit verschiedenen Alkylphosphaten vergiftet wurden, auch dann noch, wenn diese Cholinesteraseblocker in sehr hohem Überschuß angewandt wurden.

2. Die Eigenwirkung des PAM auf Cholinesterasen besteht bei dieser Verdünnung und der benutzten Methode in einer geringen Hemmung.

3. Am Beispiel eines mit E 600 in vitro vergifteten Pferdeserums wird gezeigt, daß zwei Vorgänge mit der Dauer der Vergiftung die angegebene Nachweismöglichkeit begrenzen: Die spontane Reaktivierung des Fermentes und andererseits ein fortschreitender Verlust der Reaktivierbarkeit durch PAM.

4. Beim Systox wurde in entsprechenden Versuchen bei längerer Vergiftung nur eine Verminderung der Reaktivierbarkeit beobachtet, die sich bei Aufbewahrung im Zimmer stärker auswirkte als im Eisschrank.

5. An mit E 600, E 605 und Systox vergifteten Tieren wurde der Nachweis mit PAM in Blut und Kleinhirn nach verschiedener Lagerungszeit der Kadaver im Kühlschrank und im Zimmer erprobt.

6. Zur einfachen Beurteilung wurde der Quotient:

$$\frac{\text{Cholinesteraseaktivität ohne PAM}}{\text{Cholinesteraseaktivität mit PAM}}$$

als „Index der Reaktivierbarkeit“ (IR) verwendet. Ist IR kleiner oder auch noch gleich 1, so liegt mit Sicherheit eine Alkylphosphatvergiftung vor.

7. Auch an mit E 600 protrahiert behandelten Meerschweinchen konnte der Vergiftungsnachweis geführt werden.

8. In 21 Untersuchungen bei 12 Vergiftungsfällen von Menschen wurde die Brauchbarkeit der Nachweismethode für Leichenmaterial bestätigt. In zwei Fällen konnte sogar nach 28- und 48tägiger Lagerung

des Untersuchungsgutes noch ein positives Resultat erzielt werden. Auffällig war immer wieder, daß die Cholinesterasen den Tod des Organismus lange überleben.

9. Schließlich war es bei mit E 600 und E 605 vergifteten Tieren trotz einer Therapie mit PAM später im Kleinhirn der Tierleiche noch möglich, mit Hilfe dieses Reaktivators die Vergiftung nachzuweisen.

Die Arbeit wurde durchgeführt mit Hilfe eines Warburg-Apparates und mit einer Zentrifuge, die die Deutsche Forschungsgemeinschaft dem Institut zur Verfügung gestellt hat. Wir möchten dafür unseren Dank aussprechen. Unser Dank gilt auch der Deutschen Hoffmann-La Roche AG für die großzügige Versorgung mit dem für die Versuche benötigten Acetylcholinchlorid. Weiterhin danken wir Herrn Prof. Dr. G. SCHRADER und Herrn Prof. Dr. Dr. W. WIRTH von den Farbfabriken Bayer für die zur Verfügung gestellten Alkylphosphate, sowie für das Pyridin-Aldoxim-Methjodid (PAM).

Literatur

- ALDRIGE, W. N., and D. R. DAVIES: Determination of cholinesterase activity in human blood. *Brit. med. J.* **1952 I**, 945. — AMMON, R.: Die fermentative Spaltung des Acetylcholins. *Pflüg. Arch. ges. Physiol.* **233**, 486 (1934). — AMMON, R., u. F. J. ZAPP: Eine einfache klinische chemische Methode zum Nachweis von der Cholinesterase im Serum. *Klin. Wschr.* **1955**, 759. — ANTEPOL, W., A. SCHIFRIN and L. TUCHMAN: Decreased cholinesterase activity of serum in jaundice and biliary disease. *Brit. Soc. exp. Biol. Med.* **38**, 363 (1938). — AUGUSTINSSON, K. B.: Cholinesterase a study comparative enzymology. *Acta physiol. scand.* **15**, Suppl. 52, 1 (1948). — AVERELL, P. R., and M. V. NORRIS: Estimation of small amounts of O,O-Diethyl-O-p-nitrophenylthiophosphate. *Analyt. Chem.* **20**, 753 (1948). — BARNES, J. M., and D. R. DAVIES: Blood cholinesterase levels in workers exposed to organo-phosphorus insecticides. *Brit. med. J.* **1951 II**, 816. — BETHE, K., W. D. ERDMANN, L. LENDLE u. G. SCHMIDT: Spezifische Antidot-Behandlung bei probierter Vergiftung mit Alkylphosphaten (Paraoxon, Parathion, DFP) und Eserin an Meerschweinchen. *Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmacol.* **231**, 3 (1957). — BÖHMER, K.: E 605-Vergiftungen. *Z. ges. inn. Med.* **9**, 948 (1954). — BOWEN, C. V., and F. J. EDWARDS: Polarographie determination of O,O-Diethyl-O-p-nitrophenylthiophosphate (Parathion). *Analyt. Chem.* **22**, 706 (1950). — BURGER, E.: Beiträge zum Nachweis von E 605. *Arch. Toxikol.* **16**, 401 (1957). — CALLAVAY, S., D. R. DAVIES and J. P. RUTLAND: Blood cholinesterase levels and range of personal variation in a healthy adult population. *Brit. med. J.* **1951 II**, 812. — DEMNY-PONSART, E., R. VIVARIO et C. HEUGHEM: L'intoxication par la parathion et sa recherche toxicologique. *Arch. belges Méd. soc.* **13**, 429 (1955). — DERKOSCH, J., H. JANSCH, R. LEUTNER u. F. X. MAYER: Zum Nachweis des Schädlingsbekämpfungsmittels E 605. *Mh. Chem.* **85**, 684 (1954). — DOTZAUER, G., u. W. NAEVE: Biologischer Test zum Nachweis von Insecticiden. *Zbl. allg. Path. path. Anat.* **94**, 123 (1955). — DU BOIS, K. P., J. DOULL, P. R. SALERNO and J. M. COON: Studies on the toxicity and mechanism of action of p-nitrophenyl-diethyl-thionophosphate (Parathion). *J. Pharmacol. exper. Therap.* **95**, 79 (1949). — ENDERS, A.: Beitrag zum Nachweis des E 605 im Leichenmaterial. *Arch. Toxikol.* **15**, 313 (1955). — ENDERS, A., u. G. GRUPP: Die Blutveränderungen bei chronischer Vergiftung mit dem Schädlingsbekämpfungsmittel Parathion. *Arzneimittel-Forsch.* **1**, 79 (1951). — ERDMANN, W. D., u. L. LENDLE: Vergiftungen mit esteraseblockierenden Insecticiden aus der Gruppe organischer Phosphorsäureester (E 605 und Ver-

wandte). *Ergebn. inn. Med. Kinderheilk.* **1958** (im Druck). — FISCHER, K., u. W. SPECHT: Kritische Bemerkungen zum Metasystox-Nachweis. *Arch. Toxikol.* **16**, 278 (1957). — FLEISHER, J. H., and E. J. POPE: Colorimetric method for determination of red blood and cholinesterase activity in whole blood. *Arch. industr. Hyg.* **9**, 323 (1954). — FRETWURST, F., u. W. NAEVE: Beitrag zum Nachweis des E 605 im Leichenmaterial. *Arch. Toxikol.* **15**, 185 (1955). — GRUCH, W.: Über papierchromatographische Trennung von Kontaktinsecticiden (DDT, E 605, Hexachlorcyclohexan). *Naturwissenschaften* **41**, 39 (1954). — HEIM, F.: Physiologische Schwankungen im Cholinesterasegehalt des menschlichen Serums. *Klin. Wschr.* **1944**, 63. — HEINECKER, R., u. H. LOSSE: Cholinesteraseaktivität des Serums und vegetative Tonuslage. *Klin. Wschr.* **1955**, 870. — HIRAKI, K., u. T. NAMBA: Eine kausale Therapie für Intoxikationen durch Parathion (Jap.). *Nippon Igakukai Zasshi* **37**, 691 (1957). — HOBIGER, F.: Effect of nicotinhydroxamic acid methiodide on human plasma cholinesterase inhibited by organo-phosphates containing a dialkylphosphato group. *Brit. J. Pharmacol.* **10**, 356 (1955). — Chemical reactivation of phosphorylates human and bovine true cholinesterases. *Brit. J. Pharmacol.* **11**, 295 (1956). — HUTCHINSON, A. O., and E. M. WIDDOWSON: Cholinesterase activities in the serum of healthy british children. *Nature (Lond.)* **169**, 284 (1952). — KAISER, H., u. TH. HAAG: Zum chemisch-toxikologischen Nachweis von E 605 „Bayer“ sowie einiger anderer Insecticide der Phosphorsäurereihe. *Arch. Pharm. (Weinheim)* **61**, 542 (1956). — KAISER, H., u. W. LANG: Beitrag zur qualitativen und annähernd quantitativen Bestimmung von E 605 im Blut. *Dtsch. Apoth.-Ztg* **93**, 394 (1953). — KEWITZ, H.: Die Wiederherstellung der Cholinesteraseaktivität bei der Alkylphosphat-Vergiftung durch ein spezifisches Antidot. *Klin. Wschr.* **1957**, 521. — KOMMERELL, B., u. F. H. FRENKEN: Serumcholinesterase-Aktivität bei Leberkranken. *Dtsch. med. Wschr.* **1956**, 1959. — LEHMANN, A. J.: The major toxic action of insecticides. *Bull. N.Y. Acad. Med.* **25**, 382 (1949). — LEONHARDT, J.: Tödliche Vergiftung mit Insectid E 605 (forte). *Arch. Toxikol.* **14**, 395 (1953). — LUTZ, G.: Nachweis von E 605 in der toxikologischen Analyse. *Angew. Chem.* **69**, 182 (1957). — MACHATA, G.: Über den Nachweis von E 605 und Systox in der gerichtsmmedizinischen Praxis. *Arch. Toxikol.* **16**, 119 (1956). — MATER, E. H.: Serum-Cholinesterase und Lebererkrankungen. *Dtsch. med. Wschr.* **1956**, 1674. — MOLANDER, D. W., M. FRIEDMAN and S. L. LA DUE: Serum cholinesterase in hepatic and neoplastic diseases, a primary raport. *Ann. intern. Med.* **41**, 1139 (1954). — NACHMANSOHN, D.: Die Rolle des Acetylcholins in den Elementarvorgängen der Nervenleitung. *Ergebn. Physiol.* **48**, 575 (1955). — OKINAKA, S., u. M. YOSHIKAWA: Zur Klinik der Cholinesterasen. *Münch. med. Wschr.* **1955**, 1072. — PAULUS, W., H. J. MALLACH u. W. JANITZKI: Zum Nachweis von E 605. *Arzneimittel-Forsch.* **5**, 241 (1955). — PFEIL, E.: Über den Nachweis von E 605. *Röntgen- u. Lab.-Prax.* **7**, 147 (1954). — PRIBILLA, O.: Vergiftungen mit E 605. *Arch. Toxikol.* **15**, 210 (1955). — Die Bestimmung der Serumcholinesterase in der Leiche. *Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med.* **46**, 79 (1957). — REINL, W.: Über gewerbliche Vergiftungen durch Phosphorverbindungen. *Arch. Toxikol.* **16**, 158 (1956). — SAKAI, F., H. DAL RI, W. D. ERDMANN, u. G. SCHMIDT: Atemlähmung durch Parathion oder Paraoxon und ihre antagonistische Beeinflußbarkeit. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak.* **1958** (im Druck). — SCHILF, E.: Zur Physiologie und Klinik der Cholinesterasen. *Medizinische* **1955**, 1113. — SCHMIDT, G.: Toxikologische Erfahrungen bei E 605-Vergiftungen. *Arch. Toxikol.* **15**, 361 (1955). — SCHRADER, G.: Die insecticiden Phosphorsäureester. *Angew. Chem.* **69**, 86 (1957). — SCHWERD, W., u. G. SCHMIDT: Einfache Schnellreaktion im Blut zum Nachweis von Vergiftungen mit dem Schädlingbekämpfungsmittel E 605. *Dtsch. med. Wschr.* **1952**, 372. —

SLEISENGER, M. H., T. P. ALMY, H. GILDE and G. PERLE: Colometric determination of serum cholinesterase; its value in hepatic and biliary tract diseases. *J. clin. Invest.* **32**, 466 (1953). — STUMPF, CH.: Methoden zur Bestimmung der Cholinesteraseaktivität im Blut. *Z. Vitamin-, Hormon- u. Fermentforsch.* **8**, 36 (1956). — VOGEL, G.: Vergiftungen mit dem Insektizid E 605. *Arch. Toxikol.* **14**, 381 (1953). — VORHAUS, L. J., and R. M. KARK: Serum cholinesterase in health and disease. *Amer. J. Med.* **14**, 707 (1953). — WEINIG, E., H. SCHMITT u. G. SCHMIDT: Zum Beweiswert der Reaktion von AVERELL und NORRIS beim Nachweis von E 605. *Arch. Toxikol.* **15**, 423 (1955). — WILSON, I. B.: Acetylcholinesterase. XIII. Reaktivierung von Alkylphosphat-inhibierten Enzymen. *J. biol. Chem.* **199**, 113 (1952). — The reactivation of acetylcholinesterase inhibited by tetraethylpyrophosphate and diisopropylfluorophosphate. *J. Amer. chem. Soc.* **77**, 4286 (1955). — WILSON, I. B., and S. GINSBURG: Reaktivierung von Acetylcholinesterase, die durch Alkylphosphat inhibiert ist. *Arch. biochem.* **54**, 569 (1955). — WILSON, I. B., S. GINSBURG and E. K. MEISLICH: The reactivation of acetylcholinesterase inhibited by tetraethylpyrophosphate and diisopropylfluorophosphate. *J. Amer. chem. Soc.* **77**, 4286 (1955). — WIRTH, W.: Zur Pharmakologie der insektiziden Phosphorsäureester. *Verh. dtsch. Ges. Arbeitsschutz* **2**, 101 (1954). — Zum Nachweis der E 605-Intoxikation. *Arch. Toxikol.* **16**, 125 (1956). — WOLFSI, J. H., and G. D. WINTER: Statistical analysis of normal human red blood cell and plasma cholinesterase activity values. *A.M.A. Arch. industr. Hyg.* **6**, 43 (1952).

Dr. K. D. FRIEDBERG, Göttingen, Geiststr. 9

Prof. Dr. F. SAKAI, Tokio, z. Z. Göttingen, Geiststr. 9