

erkennen, daß die Methode für die verschiedensten toxikologischen und kriminaltechnischen Zwecke zur Trennung von lipophylen Stoffgemischen angewandt werden kann [erschieden in *Mikrochim. Acta (Wien)* 1960, 79].

Dr. G. MACHATA, Wien IX, Sensengasse 2
Institut für gerichtliche Medizin der Universität

W. PIOCH (Bonn): Mordversuch und Mord durch Einspritzung von Luft, Benzin und Insulin.

Vorläufige Mitteilung über Befunde und Untersuchungen zur Aufklärung eines außergewöhnlichen Mordfalles. Die Täter injizierten ihrem Opfer zunächst erfolglos 20 cm³ Luft intravenös, dann Feuerzeugbenzin und, als die erwartete Wirkung nicht schnell genug eintrat, insgesamt 400 E Alt-Insulin in beide Oberschenkel. — Die pathologisch-anatomischen, histologischen und bakteriologischen (steriler Absceß) Befunde entsprachen im wesentlichen den in der Literatur angegebenen Beobachtungen bei akuter Benzinvergiftung. — Die postmortale Blutzuckerbestimmung im Femoralisblut ergab 30 mg-% nach HAGEDORN-JENSEN, nach der photometrischen Methode nach FRANK und KIRBERGER einen „wahren Glucosewert“ unter 10 mg-%. — Über die von den Mitarbeitern des Bonner Instituts in Zusammenarbeit mit PFEIFFER-Frankfurt unternommenen Versuche zur Rückgewinnung von Insulin aus dem Injektionsgebiet sowie den Untersuchungsgang zum Nachweis des extrahierten Insulins im Tierversuch und nach einer neuen „in vitro-Methode“ (PFEIFFER) wird berichtet. — Nach dem 1958 in England veröffentlichten Fall (BIRKINSHAW) ist dies der zweite bekanntgewordene Mord durch Injektion von Insulin.

Dr. W. PIOCH, Bonn, Wilhelmsplatz 7
Institut für gerichtliche Medizin der Universität

H. RAUDONAT (Frankfurt a. M.): Über den chemischen Nachweis von Herzsteroiden in der Leiche.

Die Herzglykoside bilden den aktiven Bestandteil einer großen Zahl aus seltenen Pflanzen gewonnener Präparate, die seit altersher als Heilmittel und Pfeilgifte Verwendung fanden. Das Glykosid-Molekül enthält neben dem Zuckeranteil, der aus Glucose oder einem körperfremden Zucker bestehen kann, ein Steringerüst, dessen Substituenten die Träger der spezifischen Herzwirkung sind, während der Zuckeranteil für die Haftfähigkeit im Gewebe und damit für die Verweildauer im Organismus von Bedeutung ist. Wenn die Herzsteroiden auch nicht zu den klassischen Mordgiften zu rechnen sind, so können doch jederzeit medizinale Vergiftungen vorkommen. Kürzlich wurde im Frankfurter Institut ein

Fall bearbeitet, in dem ein Mädchen in suicidalen Absicht Strophanthol, ein g-Strophanthin haltiges Tropfenpräparat, eingenommen hatte. Gleichzeitig sei noch an einen Mordfall erinnert, der in der Weltpresse in den Jahren 1929/30 von sich reden machte (SANDERS, FÜHNER): Ein junger Arzt hatte seiner Geliebten rectal g-Strophanthin verabreicht. Trotz stärkstem Verdacht verliefen damals alle Versuche, dieses Glykosid in der Darmschleimhaut chemisch nachzuweisen, negativ. Erst auf pharmakologischem Wege wurde ein Herzsteroid gefunden. Wir nehmen dieses zum Anlaß, über neuere chemische Nachweismethoden von Herzsteroiden zu berichten, da alle bisher beschriebenen Anreicherungs- und Reinigungsmethoden recht unbefriedigend sind und wir uns im Tierversuch eingehend mit dem Schicksal einiger Herzglykoside im Organismus befaßt haben.

Das Auffinden und der Nachweis von Herzsteroiden in der Leiche und im lebenden Organismus setzt zwar einige analytische Erfahrung voraus, mehr aber noch ein Wissen über die chemischen Veränderungen, die das Molekül durch den Zellstoffwechsel erfährt, der schon in recht kurzer Zeit, zum Teil nach weniger als einer Stunde, neue Steroide mit anderen chemisch-physikalischen Eigenschaften entstehen läßt, so daß sich der Nachweis nicht nur auf die ursprünglich verabfolgte Substanz, sondern auch auf die entstandenen Metaboliten erstrecken muß. Erschwerend kommt hinzu, daß fast ein jedes Herzsteroid, bzw. dessen Steroidanteil, seinen eigenen Abbaumechanismus besitzt. An Hand von Tierversuchen soll nun gezeigt werden, wohin der Analytiker seine Aufmerksamkeit zu richten hat.

Kürzlich berichteten wir (RAUDONAT und ENGLER) über Ausscheidungsprodukte nach oraler Verabfolgung von Herzsteroiden an Ratten im Pharmakologischen Institut. Wir verfütterten die in reinsten Form leicht zugänglichen und gut nachweisbaren Glykoside k-Strophanthosid und Thevetin. Das k-Strophanthosid besteht aus dem Genin Strophanthidin, einem Molekül Cymarose sowie 2 Molekülen Glucose, Thevetin aus Digitoxigenin, einem Thevetose- und 2 Glucoseresten. Schon 2 Std nach der Verfütterung der Glykoside enthielten Chloroformextrakte aus Harn und Kot der Tiere gut nachweisbare Mengen der glucosefreien Glykoside Cymarin und Neriifolin, außerdem 2 Metaboliten, d. h. Abbauprodukte mit intaktem Lactonring und nicht näher definiertem Zuckerrückstand. Daraufhin haben wir Ratten in Urethannarkose gelegt, Sonden in die Gallenwege gelegt und nach Verfütterung von Glykosid 2 Std lang die Galle gesammelt. In dieser Galle gelang der Nachweis von unverändertem Steroid, nicht aber der von Spaltprodukten (ENGLER, HOLTZ und RAUDONAT). Dieses bedeutet, daß die Glykoside nicht, wie bisher häufig vermutet, im Magen durch die anwesende Salzsäure eine Hydrolyse erleiden, sondern unverändert zur Resorption gelangen. Somit

blieb die Frage offen, wo im Organismus ihr Abbau erfolgt. Versuche, mit Gewebshomogenaten eine Spaltung zu erzielen, verliefen negativ. Bemerkenswert war deshalb die Tatsache, daß Inkubate mit Rattenkot eine sehr schnelle Hydrolyse der Steroide bewirken. Es entstehen die glucosefreien Glykoside Cymarin und Neriifolin, nicht aber Metaboliten. Diese Hydrolyse kann leicht verhindert werden, wenn man die Tiere mit Sulfonamiden vorbehandelt und so die Darmflora im Wachstum hemmt. Führten wir nun rectal den Ratten die glucosefreien Spaltprodukte Cymarin und Neriifolin zu, so konnten wir schon nach 2 Std beide unverändert im Harn wiederfinden. Sie wurden papierchromatographisch identifiziert.

Diese Versuche zeigen deutlich den Weg, den Glykoside nach oraler Aufnahme nehmen können: Sie passieren unverändert den Magen und werden in den ersten Darmabschnitten resorbiert. Ein Teil wird erneut durch die Galle in den Darm sekretiert (enterohepatischer Kreislauf!) ein weiterer gelangt in die tieferen Abschnitte des Darmes und wird dort durch die Darmflora schnell abgebaut. Die Spaltstücke, die noch Herzwirksamkeit besitzen, werden zum Teil rückresorbiert und sind dann im Harn nachweisbar, zum Teil auch mit dem Kot ausgeschieden. Selbst nach Verfütterung leicht löslicher Steroide sind deren Spaltprodukte noch 36 Std später im Harn und Kot zu finden.

Versuche mit menschlichem Kot haben gezeigt, daß auch dieser zur Spaltung von k-Strophanthosid und Thevetin fähig ist. Schon nach 15 min ist ein Großteil einer 1⁰/₁₀₀ k-Strophanthinlösung in 5%iger Kotsuspension zu Cymarin und Glucose gespalten. Andererseits ist zu dieser Leistung auch noch ein Kot fähig, der 96 Std bei 5° C aufbewahrt wurde. Diese Tatsache ist für den Nachweis äußerst wichtig, denn es ist wahrscheinlicher nach einer Strophanthinvergiftung die glucosefreien Steroide (Metaboliten) als noch unverändertes Glykosid zu finden. Um letzteres nachzuweisen, müßte man dann allerdings die Gallenflüssigkeit untersuchen.

Parallel mit der Hydrolyse verändert sich die Löslichkeit der Steroide. Glucosehaltige Steroide sind alkohollöslich, die glucosefreien alkohol- und chloroformlöslich, nicht löslich dagegen in Tetrachlorkohlenstoff. Steht man vor der Aufgabe aus Gewebshomogenaten oder Kot Herzsteroide zu extrahieren, so besteht deshalb die Möglichkeit, das Material vorher mit Tetrachlorkohlenstoff zu entfetten und die zuckerarmen Steroide durch Chloroformextraktion in reiner Form zu erhalten, die unmittelbar zur Papierchromatographie geeignet ist. Damit wird die schnelle Identifizierung wesentlich erleichtert.

Versuchsbeispiel. Der Harn weißer Ratten, die vorher 6 mg k-Strophanthosid erhalten hatten, wird aufgefangen und bei p_H 6,5 mit Chloroform perforiert. Das Chloroform wird eingengt und auf Schleicher-Schül-Papier 2043b, das vorher

mit Formamid imprägniert wurde, mit Xylol-Methyläthylketon 1 + 1 entwickelt. Nach 4—6 Std werden die Chromatogramme getrocknet, mit einer alkoholischen Trichloressigsäure-Chloraminlösung besprüht und bei 120° C 5 min erhitzt. Je nach Art des Steroides treten stark gelb oder blau im UV-Licht fluoreszierende Flecken auf, deren Fluoreszenz-Farbe gleichzeitig ein Kriterium für die Art des betreffenden Steroides ist.

Ein weiteres Versuchsbeispiel soll den Nachweis der glucosehaltigen Steroide — nicht chloroformlöslich — in der Gallenflüssigkeit zeigen.

Versuchsbeispiel. 5 ml Gallenflüssigkeit von Ratten, die je Tier 2 mg *k-Strophanthin* erhalten hatten, wurden eingetrocknet und mit 25 ml Äthanol extrahiert, der Extrakt von galleneigenen Steroiden durch Chloroformextraktion befreit und einer Verteilungschromatographie auf Schleicher-Schüll-Papier 2043 b mit dem System Butanol-Wasser unterworfen.

Dieses Verfahren läßt sich auch auf menschliche Galle übertragen! Wie die Beispiele zeigen, sind es vor allem Änderungen in der Löslichkeit, die der Analytiker bei der Extraktion der Steroide beachten sollte. Es wäre auch wenig erfolgversprechend, den Nachweis in Organen allein zu führen. Viel besser geeignet sind Harn, Kot und Galle. Die Veränderungen im Molekül erfaßt er sowohl papierchromatographisch, als auch durch die unterschiedliche Färbbarkeit.

Nun ist das Verhalten der einzelnen Glykoside im Organismus recht unterschiedlich. So konnten wir beim *g-Strophanthin* keinen Abbau nachweisen. Es war uns andererseits unmöglich, zugesetztes *g-Strophanthin* aus Gewebshomogenaten oder Kot durch einfache Extraktion zurückzugewinnen, erst nach Verdauung des Gewebes mittels Trypsin bei p_H 7,6 gelang der Nachweis. Die große Haftfähigkeit des *g-Strophanthins* im Gewebe mag durch seine sehr zahlreichen Hydroxylgruppen bedingt sein.

Vom *Digitoxin* ist bekannt, daß es im Organismus in 12-Stellung hydroxyliert wird und sich so in das *Digoxin* verwandelt, welches bei einer eventuellen Vergiftung nachgewiesen werden müßte. Keinen Abbau hingegen erleidet das *Convallatoxin*, das aus Digitoxigenin und Rhamnose besteht.

Unser Wissen über die Spaltung der *Scilla-Glykoside* (ENGLER) ist gering, doch findet wohl zumindest bei jenen, die Glucose am Genin enthalten, ebenfalls eine Spaltung statt. Es sei bemerkt, daß es bisher nicht gelang, im Organismus eine Veränderung am Lactonring nachzuweisen.

Abschließend soll darauf hingewiesen werden, daß es auch heute noch keinen vorgeschriebenen Analysengang zum Nachweis der Herzsteroide gibt, doch kommt dem Toxikologen die Chloroformlöslichkeit vieler Herzgifte sowie fast aller Metaboliten zustatten. Chloroformextrakte aus Harn und Kot werden ihm deshalb meist schnell einen Anhalt für eine mögliche Vergiftung mit Glykosiden geben. Das genuine

Steroid nachzuweisen ist auf Grund erheblicher Adsorption oft unmöglich. Da nach unseren Erfahrungen dessen Anreicherung in der Gallenflüssigkeit eintritt, empfehlen wir in erster Linie dort den Nachweis zu führen, indem man alkoholische Gallenextrakte einer echten Verteilungschromatographie auf Papier mit geeignetem Lösungsmittel, z. B. Butanol:Wasser, unterwirft. So sollte dieser Beitrag einen Hinweis geben, „wo“ nach einer Vergiftung durch Herzsteroid die entsprechenden Nachweise zu führen sind, das „wie“ bleibt eine Frage der Erfahrung und des Wissens über den möglichen Abbau.

Literatur

ENGLER, R.: Dr.-Diss. Frankfurt a. M. 1959. — ENGLER, R., P. HOLTZ u. H. W. RAUDONAT: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **233**, 393 (1958). — FÜHNER, H.: Samml. Vergiftungsf. **1**, 3 (1930). — RAUDONAT, H. W., u. R. ENGLER: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharm. **232**, 295 (1957). — SANDERS, H. T.: Arch. Kriminol. **86**, 33 (1930). — STOLL, A., u. J. RENZ: Helv. chim. Acta **34**, 782 (1951).

Dr. H. RAUDONAT, Frankfurt a. M.-S 10, Forsthausstr. 104
Institut für gerichtliche und soziale Medizin der Universität

G. HAUCK (Freiburg i. Br.): Zur Methanolbestimmung nach dem Widmark-Verfahren. (Mit 2 Textabbildungen.)

WIDMARKS Verfahren für die Mikrobestimmung von Äthylalkohol in biologischem Material¹ hat sich mit einigen Modifikationen allgemein eingebürgert. Das Verfahren selbst braucht hier nicht erläutert zu werden. Es sei nur darauf hingewiesen, daß die Oxydation von Äthylalkohol nicht stöchiometrisch verläuft und die Berechnung mit einer empirisch gewonnenen Umrechnungskonstanten ml n/100 Na₂S₂O₃-γ-Äthylalkohol durchgeführt wird.

Es liegt in der Natur des Widmark-Verfahrens, daß alle flüchtigen und mit Bichromat-Schwefelsäure oxydierbaren Substanzen wie Äther², Aceton³, Methanol⁴ u. a.⁵ erfaßt werden. BILDSTEN⁶ versuchte als erster, nach dem Widmark-Verfahren Methanol zu bestimmen. Die von ihm gefundene Umrechnungskonstante ml n/200 Na₂S₂O₃-γ-Methanol wurde bald angezweifelt und heute liegen viele Untersuchungen über die Methanolbestimmung nach dem Widmark-Verfahren vor. Die Umrechnungskonstanten der verschiedenen Autoren zeigen jedoch recht erhebliche Unterschiede⁷. Es schien deshalb wünschenswert, nach den Faktoren zu suchen, die die Diskrepanzen der einzelnen Ergebnisse bedingen. Dabei ist zu berücksichtigen, daß Methanol beim Widmark-Verfahren ebenso wie im Organismus^{8,9} langsamer oxydiert wird als Äthylalkohol. Die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der