

Literatur

- BRYANT, F. J., A. C. CHAMBERLAIN, A. MORGAN, G. S. SPICER: AERE HP/R 2056.
 HARRISON, G. E.: Nature (Lond.) **182**, 792 (1958).
 KULP, J. L., A. R. SCHULERT and E. J. HODGES: Strontium 90 in man. IV. Science **132**, 448—454 (1960).
 MERTEN, D., u. E. KNOOP: Umweltradioaktivität und Strahlenbelastung. Bericht II/60 des BMAt X.
 —, u. O. PRIBILLA: Die Kontamination durch Radiostrontium. Dtsch. med. Wschr. **85**, 1449—1456 (1960).

Priv.-Doz. Dr. med. Dipl.-Chem. O. PRIBILLA, Kiel, Hospitalstr. 42

A. BERNT, CH. KERDE und O. PROKOP (Berlin): Zur Frage der Verwertbarkeit von Cyanidbefunden im Leichenmaterial.

Im Rahmen der Routineuntersuchungen an unserem Institut sind Fälle zur Beobachtung gekommen, die die grundsätzliche Frage nach dem Beweiswert von Cyanidbefunden im Leichenmaterial aufwerfen.

Ausgangspunkt waren zwei besondere Fälle: Anläßlich einer Leichenöffnung wurde von den Obduzenten an unserem Institut auf Grund der suspekten Vorgeschichte in Verbindung mit dem fast negativen Leichenöffnungsbefund der allgemeine Verdacht einer Vergiftung vorsichtig geäußert. Es handelte sich um eine 29 Jahre alte Frau. Spezifische Zeichen einer Cyanwasserstoffvergiftung wurden durch die Leichenöffnung nicht festgestellt. Die Totenflecke waren unauffällig, was jedoch eine Cyanidvergiftung nicht ausschließt. Schleimhautblutungen im Magen waren vorhanden; es bestand Status menstruationis. Die Obduktion fand 2 Tage nach dem Ableben statt.

Alle zunächst durchgeführten üblichen chemischen Untersuchungen hatten ein negatives Ergebnis. Schließlich wurde — trotz Fehlens spezifischer Hinweise — auf Cyanwasserstoff untersucht. Inzwischen waren 6 Tage seit der Leichenöffnung vergangen. Während in den Organen und im Gehirn sich keine Spuren von Cyaniden nachweisen ließen, konnte im Mageninhalt und im Blut eine Cyanidkonzentration von jeweils 500 µg-% gefunden werden. Das von uns erstattete Gutachten bezeichnete die im Blut und Mageninhalt festgestellte Cyanidmenge bei einer perakut wirkenden Vergiftung als toxisch. Ein von dritter Seite erstattetes Zusatzgutachten hielt eine Cyanidvergiftung für sehr fragwürdig, weil unter anderem die Totenflecke keine charakteristische Färbung zeigten und in den Organteilen kein positiver Befund zu erheben war. Im Hinblick auf die späteren Versuche muß erwähnt werden, daß sich das Untersuchungsmaterial von der Leichenöffnung an bis zum Tag der chemischen Untersuchung im gekühlten Asservatenraum befand.

Als kurz darauf auf einem größeren Gut einige Tiere unter verdächtigen Umständen verstarben, wurden gleichfalls Organproben dieser Tiere sowie der Mageninhalt auf Cyanide untersucht. Die Proben verliefen negativ. Tests und Protokolle waren einwandfrei und sorgfältig ausgearbeitet worden. Anlässlich einer Rückfrage wurden die Proben nach einigen Tagen Aufbewahrung im gekühlten Asservatenraum erneut untersucht. Es fanden sich mehrfach positive Cyanwasserstoffwerte. Spätere Untersuchungen verliefen negativ.

Daraufhin wurden von uns mit Mageninhalt verschiedener Leichen Untersuchungen angestellt. Die Speisebreimengen (mit negativem Cyanidbefund) wurden frisch und nach längerer Aufbewahrung erneut untersucht. Es fanden sich positive Cyanidbefunde in einigen Fällen, wobei die Aufbewahrungstemperatur von entscheidender Bedeutung zu sein schien. Die Aufbewahrung mußte offenbar in der Kälte stattfinden. Wegen der großen Bedeutung für die gerichtsmedizinische Begutachtung haben wir daraufhin systematische Untersuchungen angestellt, die unter anderem besonders unter dem Aspekt einer eventuellen fermentativen Freisetzung von Cyaniden aus dem organischen Material des Mageninhaltes bzw. des Blutes durch Bakterien oder Pilze durchgeführt wurde.

Vor der kritischen Betrachtung unserer Versuchsergebnisse sollen noch einige Probleme bzw. Möglichkeiten diskutiert werden, die unter Umständen geeignet sein könnten, die gefundenen Werte mehr oder weniger zu verfälschen bzw. ihren Aussagewert herabzumindern. Zu diesen zählen:

1. Methodische Fehler der Analyse bzw. ungenügende Spezifität der Nachweisreaktion;

2. ein normaler Cyanidgehalt im untersuchten biologischen Material;

3. cyanwasserstoffsäureabbauende Verbindungen, die zusammen mit der Nahrung aufgenommen werden.

1. Für die Testung der vielen Untersuchungsproben wählten wir die Berliner-Blau-Reaktion in der meist angewandten Testfleckentechnik. Dadurch war es möglich, mit verhältnismäßig wenig Zeitaufwand und mit hoher Spezifität sowohl eine qualitative als unter Berücksichtigung der Problemstellung auch eine hinreichend quantitative Aussage über die vorhandenen Cyanwasserstoffverbindungen zu erhalten. Unter der Voraussetzung einer sachgemäßen Durchführung der Analysen ist uns bisher nichts über eine ungenügende Spezifität dieser Reaktion — auch nicht in biologischem Material bei fortgeschrittenen Fäulniserscheinungen — bekanntgeworden (GETTLER 1947, SEIFERT 1952). Nur ein wenn auch schwacher Einwand mußte näher geprüft werden.

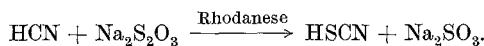
1955 berichteten SCHÜTTE und KIESOW und vordem 1950 schon LINDAHL, daß bei der Chloridbestimmung nach VAN SLYKE in eiweißhaltigem Material Cyanwasserstoffsäure entstehen kann. Nach Auffassung der Autoren kommt es nur dann zur Cyanwasserstoffsäurebildung, wenn in den Proteinen bzw. Aminosäuren die Ortho- oder Parastellungen zur Oxy- oder Aminogruppe frei waren (so z. B. im Tyrosin und Tryptophan). Über den Mechanismus der angenommenen Ringsprengung

ist nichts Näheres bekannt. Obgleich die Proteine bei der erwähnten Chloridbestimmung bei höheren Temperaturen ungleich stärkeren Reagentien (so z. B. 65%iger Salpetersäure oder Chromschwefelsäure) als bei der Testfleckenmethode ausgesetzt werden, schien uns der absolute Ausschluß dieser Möglichkeit der Cyanwasserstoffbildung doch erstrebenswert. Wir konnten erwartungsgemäß in keiner der von uns getesteten Aminosäuren unter den bekannten Versuchsbedingungen der Testfleckenmethode Spuren von Cyanwasserstoff beobachten.

2. Über das mögliche Vorkommen eines normalen, meßbaren Cyanidgehaltes im Blut und im Gewebe wurden schon zahlreiche Untersuchungen angestellt. Die mitunter sehr unterschiedlichen Ergebnisse und Schlußfolgerungen dürften jedoch in erster Linie auf die verschieden angewandten Untersuchungsmethoden zurückzuführen sein, da die sicherlich sehr geringen Cyanidkonzentrationen sich nur mit sehr empfindlichen Methoden erfassen lassen.

Während GETTLER und BAINE (1938) auf Grund ihrer zahlreichen Versuche ein natürliches Vorkommen von Cyaniden im Blut und im Gewebe verneinten, berichteten BOXER und RICKARDS (1952), daß ihre Konzentration in Körperflüssigkeiten kleiner als $0,4 \mu\text{g}\text{-\%}$ ist. FELDSTEIN u. Mitarb. (1954) fanden bei der Prüfung der Angaben von FOWLER, daß der normale Cyanidspiegel im Blutplasma von gesunden und an multipler Sklerose erkrankten Menschen sich nicht signifikant unterscheidet und zwischen 0 und $14 \mu\text{g}\text{-\%}$ schwankt. Die Entstehung des normalen Cyanidspiegels führen sie im wesentlichen auf eine entsprechende Nahrungsaufnahme zurück. Gemessen an den von uns festgestellten Werten, sind diese Normalwerte sehr niedrig und für die Beurteilung praktisch zu vernachlässigen.

Es wird angenommen, daß geringe Cyanwasserstoffmengen vom Organismus durch Anlagerung von Schwefel unter Bildung von Rhodanwasserstoff bzw. dessen Salzen entgiftet werden können. LANG (1933) konnte nachweisen, daß Cyanwasserstoff in Gegenwart von Thiosulfat mit Hilfe eines Enzyms, das er Rhodanese nannte, zu Rhodanwasserstoff umgesetzt wird.



Diese Reaktion kann zwar durch Zugabe von Natriumhydrogensulfit behindert, jedoch nicht durch eine entsprechende Gleichgewichtsverschiebung rückläufig gemacht werden. GOLDSTEIN und RIEDERS (1953) konnten z. B. durch Zugabe von Cyanwasserstoff bindenden Stoffen (Hämoglobin) zu Rhodanidlösungen oder durch einen größeren Überschuß an Natriumsulfit auch nach längerer Inkubationsdauer bei 35°C keine Spuren von Cyanwasserstoffbildung feststellen.

Der Organismus vermag bei Zuführung von toxischen Dosen an Rhodaniden Cyanwasserstoff in gewissen Mengen zu bilden. Nach GOLDSTEIN und RIEDERS ist es ebenfalls ein enzymatischer Prozeß, der auch *in vitro* mit dem isolierten Enzym der Thiocyanatoxydase ablaufen kann. Unter günstigen Versuchsbedingungen ($\text{pH}=7,4$, 40°C und Rhodanidkonzentrationen bis zu $0,075 \text{ Mol/l}$) werden bis zu 1% der Rhodanide in Cyanwasserstoff umgewandelt.

Nach unserer Auffassung dürfte dieser enzymatische Prozeß bei unseren Versuchen keine Rolle spielen, da wir im Gegensatz dazu ein niedrigeres Temperaturoptimum festgestellt haben. Außerdem könnte die maximale Umwandlungsrate von 1% die von uns festgestellten verhältnismäßig hohen Cyanwasserstoffkonzentrationen (500 — $800 \mu\text{g}\text{-\%}$) nicht erklären.

Einige Körperflüssigkeiten, wie z. B. Speichel, Urin und Magensaft, weisen einen relativ hohen Normalspiegel an Rhodaniden auf, der nach BOXER und RICKARDS (1952) die normale Cyanidkonzentration um das 500—1000fache übersteigt. Bei einigen Rhodanidbestimmungsmethoden in biologischem Material wird der Rhodanwasserstoff zu Cyanwasserstoff oxydiert und dieser entweder nach der Testflecken-

methode oder nach anderen Farbreaktionen bestimmt. Da die Oxydation schon mit relativ schwachen Oxydationsmitteln ($0,001\text{ n KMnO}_4$) durchführbar ist, mußte geprüft werden, ob eine Cyanwasserstoffbildung unter den Bedingungen der Testfleckenmethode möglich ist. Während reine Rhodanidlösungen auch in Konzentrationen von $5-30\text{ }\mu\text{g/ml}$ nach der Oxydation mit $0,001\text{ n KMnO}_4$ eine fast theoretisch zu erwartende Berliner-Blau-Bildung ergaben, konnte im nichtent-eiweißten Blut (so wie es auch zur Testfleckenmethode verwendet wird) unter gleichen Oxydationsbedingungen kein Cyanwasserstoff nachgewiesen werden. Selbst wenn dem Blut Rhodanide in einer Konzentration von $5-500\text{ }\mu\text{g/ml}$ zugesetzt wurden, so daß der normale Rhodanidspiegel im Blut mit Sicherheit überschritten wurde, konnten keine Blaufärbungen beobachtet werden.

Daß die von uns beobachtete postmortale Cyanidbildung nicht durch Umwandlung von Rhodanwasserstoff erklärbar ist, ergibt sich auch durch folgende Überlegungen: Wenn man annimmt, daß entweder auf enzymatischem Wege oder durch einen Oxydationsprozeß der Rhodanidgehalt im Blut ($85-250\text{ }\mu\text{g-}\%$) vollständig in Cyanwasserstoff überführt werden kann, wären die von uns festgestellten hohen Konzentrationen von $500-800\text{ }\mu\text{g-}\%$ nicht erklärbar. Eine Entstehung von Cyanwasserstoff auf diesem Wege kann somit ausgeschlossen werden.

3. Die in der dritten Gruppe genannten Verbindungen müssen einen bestimmten Molekülaufbau haben, aus dem sich entweder durch Einwirkung von Fermenten oder Chemikalien unter normalen oder auch unter Versuchsbedingungen leicht Cyanwasserstoff abspalten läßt. Das heißt, daß eine $\text{C} \equiv \text{N}$ -Bindung im Molekül bereits vorhanden sein muß. Eine Neubildung einer $\text{C} \equiv \text{N}$ -Bindung (etwa aus bestimmten Aminosäuren) war zumindest bei unseren Versuchsbedingungen auszuschließen.

Aus dem Pflanzenreich sind zahlreiche Familien und Arten (etwa 750) bekannt, die nach verschiedenen und teilweise noch nicht hinreichend aufgeklärten Mechanismen Cyanwasserstoff abzuspalten vermögen. Man kann dabei je nach dem Fermentsystem bestimmte Typen der Cyanogenese unterscheiden (HEGNAUER 1959). Am bekanntesten auch hinsichtlich des Abspaltungsmechanismus ist der Amygdalin-Typus, wie er z. B. auch in den Fruchtkernen verschiedener Kernobstarten vorliegt. Viele andere Typen, so z. B. der Linamarintypus, dürften jedoch vornehmlich nur für die Veterinärtoxikologie von Bedeutung sein. Interessant ist in diesem Zusammenhang, daß die toxische Wirkung von *Taxus baccata* bisher nur einem Alkaloidgemisch, dem sog. Taxin, zugeschrieben wurde. Wie jedoch HEGNAUER berichtet, können die verschiedenen Taxusarten zum Teil sehr erhebliche Mengen Cyanwasserstoff (bis zu $100\text{ }\mu\text{g-}\%$) abspalten.

Bei der Untersuchung einiger Nahrungsmittel und Früchte machten wir die Beobachtung, daß geräucherte Fleisch- und Wurstproben — besonders deren äußerste Schicht — positive Färbungen nach der Testfleckenmethode ergaben. Ihre Intensität war allerdings bedeutend geringer als bei einer Cyanwasserstoff-Vergiftung bzw. auch bei unseren späteren Versuchen. Die geringe Cyanwasserstoffbildung dürfte sicherlich auf die starke thermische Behandlung der im Fleisch vorhandenen Eiweißverbindungen zurückzuführen sein.

In diesem Zusammenhang erinnerten wir uns einer bisher nicht bewiesenen Annahme, daß es auch in Brändleichen zu einer Bildung von Cyanwasserstoff kommen soll. Tatsächlich konnten wir auch im Mageninhalt einer teilweise stark verkohlten Leiche Cyanwasserstoff in einer Konzentration von etwa $100\text{ }\mu\text{g-}\%$ nachweisen. Die Untersuchungen der Blut- und Organproben verliefen jedoch eindeutig negativ. Der alleinige Nachweis von Cyanwasserstoff im Mageninhalt würde zwar nicht unbedingt im Widerspruch zu den allgemeinen Erfahrungen bei Cyanwasserstoffvergiftungen stehen (SEIFERT 1952), jedoch war nach der

Vorgeschichte eine Cyanidvergiftung so gut wie ausgeschlossen. Aber auch für die vorgenannte Annahme sprach dieser Befund nicht, da gerade die der Brandeinwirkung ausgesetzten Körperpartien keine Cyanidspuren aufwiesen, während nur der relativ gut von der Hitzeinwirkung abgeschirmte Mageninhalt eine positive Reaktion zeigte.

Zu dieser Stoffgruppe muß ferner noch das Vitamin B_{12} gezählt werden, das gemäß der Strukturaufklärung eine Cyanocobalaminoverbindung darstellt. Der im Molekül gebundene Cyanwasserstoff lässt sich verhältnismäßig leicht wieder abspalten. Wenn man jedoch bedenkt, daß im Magensaft z. B. nur etwa 0,09—0,16 µg pro ml Vitamin B_{12} vorhanden sind und dieses wiederum nur 1,9% Cyanid enthält, dürfte auch Vitamin B_{12} als entscheidender Cyanwasserstofflieferant nicht in Frage kommen (BOXER und RICKARDS 1951).

1938 veröffentlichten GETTLER und BAINE die Ergebnisse ihrer Versuche zum postmortalen Entstehen von Cyanwasserstoff. Sie ließen Leber- und Nierenproben, in denen ursprünglich keine Spuren von Cyanwasserstoff nachweisbar waren, bei Zimmertemperatur bis zu maximal 2 Monaten stehen und prüften in verschiedenen Zeitabständen auf Cyanwasserstoff. Sie konnten den Beweis erbringen, daß in dem zum Teil sehr fauligen biologischen Material postmortal Cyanwasserstoff in Konzentrationen von 0,01—0,03 mg-% gebildet wird. Die oberste Grenze dieser Konzentrationsangabe entspricht nach ihren Erfahrungen etwa nur $\frac{1}{10}$ der niedrigsten Konzentration, die normalerweise bei Cyanwasserstoffvergiftungen festgestellt wurde, so daß nach ihrer Meinung eine Abgrenzung von einer Cyanwasserstoffvergiftung einwandfrei möglich ist.

Im Gegensatz zu den Feststellungen fiel uns in einigen Vorversuchen jedoch die hohe Cyanwasserstoffkonzentration in Mageninhalt und Blut auf, die in dem bereits geschilderten Fall zunächst zur Annahme einer Cyanwasserstoffvergiftung führte. Nachdem bereits bei uns Zweifel aufgetaucht waren, konnte auf Grund der weiter geführten Ermittlungen der Verdacht einer Cyanidvergiftung nicht aufrechterhalten werden.

Nachdem die Spezifität der Testfleckenmethode bestätigt worden war, blieb zu klären, ob die gelegentlich beobachteten hohen Cyanwasserstoffkonzentrationen, die mit Sicherheit nicht auf eine Cyanwasserstoffvergiftung zurückzuführen waren, sich versuchsweise reproduzieren lassen. Ziel unserer Versuche war, die Bedingungen und möglicherweise auch den Mechanismus der postmortalen Cyanwasserstoffentstehung kennenzulernen und eine Abgrenzung von einer wirklichen Cyanwasserstoffvergiftung zu ermöglichen.

Eigene Versuche

Die Versuche wurden unter folgenden Bedingungen angesetzt:

1. Zuerst wurde die Temperaturabhängigkeit geprüft. Die unmittelbar bei der Sektion aus dem Mageninhalt entnommenen Proben wurden in sterilisierte Erlenmeyerkolben gebracht und jeweils für die Dauer von 7 und 14 Tagen im Brutschrank bei 37° sowie im Kühlschrank bei 4° aufbewahrt. Zuvor wurden die Mageninhalte nach der Testfleckenmethode auf Cyanide untersucht sowie der pH-Wert ermittelt. Wie die Tabelle I zeigt, konnte bei den im Brutschrank aufbewahrten Proben weder nach 7 noch nach 14 Tagen eine Cyanwasserstoffbildung beobachtet werden.

Tabelle 1. Temperaturabhängigkeit + pH-Wertverschiebung

| Mageninhalte | Anzahl | Nach der Obduktion | | | | Brutschrank 7 Tage | | | | Brutschrank 14 Tage | | | | Kühlschrank 14 Tage | | | |
|-----------------------------------|--------|--------------------|---------|-------|-----------|--------------------|---------|-------|-----------|---------------------|---------|-------|-----------|---------------------|---------|-------|-----------|
| | | HCN | | pH | | HCN | | pH | | HCN | | pH | | HCN | | pH | |
| | | positiv | negativ | sauer | alkalisch | positiv | negativ | sauer | alkalisch | positiv | negativ | sauer | alkalisch | positiv | negativ | sauer | alkalisch |
| Nur im Brutschrank | 9 | 1 | 8 | 8 | 1 | Ø | 9 | 2 | 7 | Ø | 9 | 5 | 4 | | | | |
| Nur im Kühlschrank | 4 | Ø | 4 | 1 | 3 | | | | | | | | | 1 | 3 | 1 | 3 |
| Parallel i. Brut- und Kühlschrank | 16 | 1 w | 15 | 14 | 1 | Ø | 16 | 2 | 11 | Ø | 16 | 3 | 13 | 12 | 4 | 6 | 10 |
| | | | | N: | 1 | | | | N: | 3 | | | | | | | |

N = nicht geprüft; w = schwach positiv.

Auch ein ursprünglich Cyanwasserstoff enthaltender Mageninhalt, der von einer Cyanidvergiftung stammte, wurde im Laufe dieser Aufbewahrung bereits nach 7 Tagen negativ. Gleichzeitig konnte beobachtet werden, daß zahlreiche, zunächst sauer reagierende Mageninhalte nach der Aufbewahrung alkalisch wurden.

Im Gegensatz dazu fanden sich von 20 14 Tage lang im Kühlschrank aufbewahrten Mageninhalten 13 Cyanwasserstoff enthaltende Proben. Die festgestellten Konzentrationen sind aus Tabelle 6 ersichtlich. Die pH-Wertverschiebung entsprach etwa der im Brutschrank.

2. Wie aus den Versuchen der Tabelle 1 ersichtlich, fanden nur in einem Teil der Proben Verschiebungen des pH-Wertes ins Alkalische statt. Da die überwiegende Mehrzahl der positiv gewordenen Mageninhalte jedoch alkalisch reagierte (von 13 waren 11 alkalisch), lag die Vermutung nahe, daß bei von vornherein alkalischem Untersuchungsmaterial mehr positive Proben zu erwarten wären, da unter den hier vorliegenden Versuchsbedingungen (mit Zellstoff verschlossene Erlenmeyerkolben) sich der entstehende Cyanwasserstoff im sauren Milieu schneller verflüchtigt. Deshalb wurden nach Prüfung des pH-Wertes vom gleichen Untersuchungsmaterial eine Probe mit Phosphatpuffer vom pH-Wert 4 bzw. später mit verdünnter Salzsäure angesäuert, eine zweite mit Phosphatpuffer vom pH-Wert 9,5 bzw. später mit verdünnter Natronlauge alkaliert. Sonst blieben die Versuchsbedingungen die gleichen.

Die Ergebnisse zeigt Tabelle 2. Auch bei dieser Versuchsreihe ließ sich feststellen, daß lediglich diejenigen Proben Cyanwasserstoff enthielten, die auch nach 14tägiger Aufbewahrung im Kühlschrank noch alkalisch reagierten. Daneben war zu bemerken, daß eine Anzahl der ursprünglich alkalierten Mageninhalte wieder sauer geworden war.

Tabelle 2. pH-Veränderung

| Mageninhalte | Anzahl | Nach der Obduktion | | | | Brutschrank 14 Tage | | | | Kühlschrank 14 Tage | | | |
|-------------------------------|--------|--------------------|---------|-------|-----------|---------------------|-------------|-------|-----------|---------------------|------------|-------------|------------|
| | | HCN | | pH | | HCN | | pH | | HCN | | pH | |
| | | positiv | negativ | sauer | alkalisch | positiv | negativ | sauer | alkalisch | positiv | negativ | sauer | alkalisch |
| c: + Phosphat-puffer pH = 4 | 12 | 1 | 11 | 7 | 5 | Ø | 24 (c+d) | 12 | 10 | 1d | 12c 11d | 17 (c+d) | 7 (c+d) |
| d: + Phosphat-puffer pH = 9,5 | | | | | | | | | | | | | |
| c: + HCl | 7 | Ø | 7 | 7 | Ø | Ø | 14 (c+d) | 8 | 6 | 3d | 4d | 8 (c+d) | 6 (c+d) |
| d: + NaOH | | | | | | | | | | | | | |

N = nicht geprüft.

Positive Proben nach Aufbewahrung im Brutschrank fanden sich auch in dieser Versuchsreihe nicht.

3. Nachdem eine gewisse Temperatur- und pH-Abhängigkeit festgestellt worden war, wurde geprüft, ob der Zusatz bestimmter Stoffe zu den Mageninhalten, deren Zusammensetzung naturgemäß sehr unterschiedlich war, einen Einfluß auf die Bildung von Cyanwasserstoff ausübt. Wie aus Tabelle 3 ersichtlich, wurden unter den bereits beschriebenen Bedingungen angesetzt:

- a) unveränderte Mageninhalte;
- b) c- und d-Mageninhalte (s. Tabelle 2), die im vorangegangenen Versuch negativ geblieben waren und denen je $\frac{1}{2}$ Tablette Pepsacid zugesetzt wurde;
- c) Mageninhalte auf Merck II-Nährböden;
- d) Mageninhalte auf cyanidfreiem Organbrei (Herz, Leber, Niere).

Auch hier fanden sich keine positiven Werte der Proben, die im Brutschrank aufbewahrt wurden. Dagegen konnte festgestellt werden, daß von insgesamt 33 auf Merck II-Nährböden verbrachten Mageninhalten 16 positive Reaktionen zeigten. Zusätze von Pepsacid und Organbrei blieben offensichtlich ohne Wirkung, während sich unter den 17 Proben ohne Zusatz im Kühlschrank 3 positive fanden. Im allgemeinen waren die positiven Befunde auch hier nur in alkalisch reagierenden Proben festzustellen.

4. Auf nahezu allen Proben, die im Kühlschrank aufbewahrt worden waren, fand sich ein intensives Pilzwachstum. Nicht zuletzt die bisher ermittelten günstigsten Bedingungen für die Entstehung des Cyanwasserstoffes (niedriges Temperaturoptimum, alkalischer pH-Wert und Steigerung durch Zusatz von Merck II-Nährboden) ließen an die Möglichkeit einer Entstehung des Cyanwasserstoffes durch Pilze denken. In

Tabelle 3. Nährbodenabhängigkeit

| Mageninhalte | Anzahl | Nach der Obduktion | | | | Brutschrank 14 Tage | | | | Kühlschrank 14 Tage | | | |
|---|--------|--------------------|---------|-------|-----------|---------------------|---------|-------|--------------|---------------------|------------|-------------|---------------------|
| | | HCN | | pH | | HCN | | pH | | HCN | | pH | |
| | | positiv | negativ | sauer | alkalisch | positiv | negativ | sauer | alkalisch | positiv | negativ | sauer | alkalisch |
| Ohne Nährboden | 17 | Ø | 17 | 12 | 4 N: 1 | Ø | 17 | 9 | 6 N: 2 | 3d | 14d 17c | 19 (c+d) | 13 (c+d) N: 2 |
| Negativ gebliebene d- und c-Mageninhalte + je $\frac{1}{2}$ Tbl. Pepsacid | 8 | Ø | 8 | N | N | N | N | N | N | Ø | 8 | 4 | 4 |
| Auf Merck-II-Nährboden | 33 | 3 | 30 | 24 | 7 N: 2 | Ø | 22 | 4 | 18 | 16 | 10 | 12 | 14 |
| Auf cyanidfreiem Organbrei | 5 | Ø | 5 | N | N | N | N | N | N | Ø | 5 | N | N |

N = nicht geprüft.

Tabelle 4. Überimpfen von Pilzrasen

| Pilzrasen von positiven Mageninhalten | Anzahl | Vor dem Verimpfen | | | | Brutschrank 14 Tage | | | | Kühlschrank 14 Tage | | | |
|--|--------|-------------------|---------|-------|-----------|---------------------|---------|-------|-----------|---------------------|---------|-------|-----------|
| | | HCN | | pH | | HCN | | pH | | HCN | | pH | |
| | | positiv | negativ | sauer | alkalisch | positiv | negativ | sauer | alkalisch | positiv | negativ | sauer | alkalisch |
| Verimpft auf neg. gebliebene d-Mageninhalte | 7 | 4 | 3 | 2 | 5 | Ø | 7 | 3 | 4 | 2 | 5 | 2 | 5 |
| Verimpft auf Merck II-Nährboden + 40 g Glucose/l | 6 | 5 | 1 | 1 | 5 | N | N | N | N | Ø | 6 | 6 | N |

N = nicht geprüft.

Tabelle 5. Untersuchungen von Blutproben auf postmortale Entstehung von Cyanwasserstoff

| Material | Anzahl | Sofortige HCN-Probe | Nach 14tägiger Aufbewahrung im Brutschrank HCN | | Nach 14tägiger Aufbewahrung im Kühlschrank HCN | |
|-----------------------------------|--------|---------------------|--|---------|--|---------|
| | | | positiv | negativ | positiv | negativ |
| | | | | | | |
| Blute lebender Personen | 111 | neg. | Ø | 111 | Ø | 111 |
| Leichenblute | 36 | neg. | Ø | 36 | 6 | 30 |

einem solchen Falle müßte die Möglichkeit bestehen, unter den genannten Versuchsbedingungen negativ gebliebenes Versuchsmaterial durch Über-

impfen von Pilzkulturen, die auf positiven Mageninhalten gewachsen waren, zu einer Cyanwasserstoffbildung anzuregen. Tabelle 4 zeigt

Tabelle 6. *Positive Mageninhalte und Blute*

| Lfd. Nr. | Nr. der Probe | Kühlschrankdauer | p _H bei Unter- suchung | CN- Gehalt μg % |
|-------------|------------------|--------------------|---|-----------------------|
| 1 | 8 | 14 Tg. | alk. | 10 |
| 2 | 11a | 14 Tg. | alk. | 100 |
| 3 | 16c | 14 Tg. | sauer | 33,3 |
| 4 | 16c | 14 Tg. später | alk. | 30 |
| 5 | 17c | 14 Tg. | alk. | 600 |
| 6 | 17c | 14 Tg. später | alk. | 50 |
| 7 | 18c | 14 Tg. | alk. | 150 |
| 8 | 18c | 14 Tg. später | alk. | 40 |
| 9 | 20c | 14 Tg. | alk. | 675 |
| 10 | 20c | 14 Tg. später | alk. | 150 |
| 11 | 21c | 14 Tg. | alk. | 750 |
| 12 | 21c | 14 Tg. später | alk. | 175 |
| 13 | 23c | 14 Tg. | alk. | 80 |
| 14 | 24c | 14 Tg. | alk. | 400 |
| 15 | 24c | 14 Tg. später | alk. | 60 |
| 16 | 25c | 14 Tg. | alk. | 110 |
| 17 | 25c | 14 Tg. später | alk. | 20 |
| 18 | 26c | 14 Tg. | alk. | 5 |
| 19 | 27c | 14 Tg. | alk. | 450 |
| 20 | 27c | 14 Tg. später | sauer | 100 |
| 21 | 28c | 14 Tg. | sauer | Spuren |
| 22 | 27c/33d | 14 Tg. später | alk. | 90 |
| 23 | 29c | 14 Tg. | alk. | 90 |
| 24 | 30c | 14 Tg. | sauer | 70 |
| 25 | 30c | 14 Tg. später | alk. | 30 |
| 26 | 30c/31d | 14 Tg. später | alk. | 90 |
| 27 | 32d | 14 Tg. | sauer | 166 |
| 28 | 36oW | 14 Tg. offen | alk. | 100 |
| 29 | 36oE | 14 Tg. offen | alk. | 500 |
| | | 14 Tg. später | | 100 |
| 30 | 36oB | 14 Tg. Brutschrank | N | neg. |
| | | 14 Tg. Kühlschrank | N | 40 |
| 31 | 45c | 14 Tg. | N | 300 |
| 32 | 45d | 14 Tg. | N | 150 |
| 33 | 47d | 14 Tg. | alk. | 675 |
| 34 | 50d | 14 Tg. | alk. | 120 |
| 35 | 51d | 14 Tg. | alk. | 175 |
| 36 | 61WO | 7 Tg. | N | 190 |
| 37 | 54a | 14 Tg. | N | 40 |
| 38 | 70b | 7 Tg. Kühlschrank | N | 20 |

N = nicht geprüft.

die entsprechenden Versuche. Beim Überimpfen von Pilzrasen mit der ausgeglühten Platinöse auf Merck II-Nährböden konnte keine Cyanwasserstoffbildung erzielt werden, dagegen ließ sich in zwei im Vorversuch negativ gebliebenen d-Mageninhalten (s. Tabelle 2) nach der Überimpfung Cyanwasserstoff nachweisen.

5. Da auch im Blut die verhältnismäßig hohen Cyanwasserstoffwerte festgestellt worden waren, ergab sich auch hier die Notwendigkeit der Untersuchung. Unter gleichen

Versuchsbedingungen wurden, wie Tabelle 5 zeigt, ebenfalls nur nach Aufbewahrung im Kühlschrank, vornehmlich in alkalischem Milieu, positive Befunde erhalten.

6. In Anlehnung an die Versuche von GETTLER wurden Hirnbrei, Leber, Niere und Herzmuskel unter verschiedener Temperaturbedingungen (4° und Zimmertemperatur) bis zu

3 Monaten, zum Teil in verschlossenen Gefäßen, zum Teil offen, aufbewahrt und in bestimmten Abständen untersucht. Eine Entstehung von Cyanwasserstoff konnte von uns nicht beobachtet werden.

In Tabelle 6 werden alle Mageninhalte und Blutproben zusammengefaßt, in denen eine postmortale Cyanwasserstoffentstehung nachgewiesen werden konnte, unter gleichzeitiger quantitativer Auswertung der Testfleckenmethode. Hier wird noch einmal deutlich, daß Cyanidwerte erhalten wurden, die weit über denen lagen, die bisher als Höchstwerte der postmortalen Cyanwasserstoffsbildung angesehen wurden und die sich unter Umständen mit denen einer Cyanidvergiftung vergleichen lassen.

Im Hinblick auf die bei Cyanwasserstoffvergiftung gemachten Erfahrungen, daß vorhandener Cyanwasserstoff sich mitunter schon nach kurzer Zeit nicht mehr nachweisen läßt, war das weitere Verhalten des postmortal entstandenen Cyanwasserstoffes von Interesse. Wie aus Tabelle 7 hervorgeht, wurde eine dem Verhalten des Cyanwasserstoffes bei der Vergiftung vergleichbare Abnahme festgestellt.

Tabelle 7. Verhalten des postmortal entstandenen Cyanwasserstoffes

| Ma- terial- Nr. | Cyanwasserstoffgehalt in $\mu\text{g} \%$ nach | | |
|-----------------------|--|--|---|
| | 14 Tagen im Kühlschrank | weiteren 14 Tagen im Kühlschrank | weiteren ... Tagen im Kühlschrank |
| 16 | 33 | 30 | 14 Tg./negativ (n. Überimpfung) desgl. |
| 17 | 600 | 50 | |
| 18 | 150 | 40 | " |
| 20 | 675 | 150 | " |
| 21 | 750 | 175 | " |
| 23 | 80 | negativ | |
| 24 | 400 | 60 | " |
| 25 | 110 | 20 | " |
| 26 | 5 | negativ | |
| 27 | 450 | 100 | 14 Tg./100 (n. Überimpfung) |
| 28 | Spuren | negativ | |
| 29 | 90 | negativ | |
| 30 | 70 | 30 | 14 Tg./90 (n. Überimpfung) 28 Tg./negativ |
| 32 | 166 | — | |
| 36 oE | 500 | 100 | |
| 36 oB | negativ im Brutschrank | 40 | |
| 54 a (Blut) | 40 | — | 70 Tg./5 |
| 70 b | 7 Tg./2 | negativ | |
| 74 b | 4 Tg./12 | 5 | 70 Tg./negativ |
| 74 c | 4 Tg./12 | 2 | 70 Tg./negativ |
| 81 | 4 Tg./20 | 7 Tg./2 | 50 Tg./4 |

Diskussion

Eindeutig ist gesichert, daß postmortal Cyanwasserstoff entsteht. Entgegen den bisherigen Auffassungen und den Ergebnissen von GETTLER konnten wir etwa zehnfach höhere Konzentrationen im Mageninhalt und im Blut feststellen. Das Maximum der Cyanwasserstoffsbildung wurde in unseren Versuchen im allgemeinen etwa 7—14 Tage nach Todeseintritt erreicht. Danach läßt sich im Laufe der Zeit eine Abnahme der Konzentration bis zum völligen Verschwinden feststellen, die dem Verhalten des Cyanwasserstoffes bei Cyanidvergiftungen vergleichbar ist. Als optimale

Bedingungen für die postmortale Entstehung von Cyanwasserstoff ließen sich ermitteln:

1. ein Temperaturoptimum bei etwa 4° C;
2. schwach alkalisches bis alkalisches Milieu;
3. Zusätze zum Versuchsmaterial, die der Zusammensetzung des Merck II-Nährbodens entsprechen.

Eine Beziehung zwischen Cyanwasserstoffbildung und Todesursache konnte nicht festgestellt werden.

Durch diese Versuchsergebnisse kann eine exakte Abgrenzung von einer tatsächlichen Cyanwasserstoffvergiftung zumindest erheblich erschwert werden. Das ist besonders dann der Fall, wenn eine Cyanidbestimmung infolge besonderer Umstände nicht unmittelbar im Anschluß an den Todeseintritt durchgeführt werden kann, da die im allgemeinen übliche Art der Aufbewahrung von Leichen wie auch der bei der Sektion entnommenen Asservate weitgehend unseren Versuchsbedingungen entspricht.

Unserer Erfahrung nach lassen sich sofort nach Todeseintritt untersuchte Fälle fraglicher Cyanwasserstoffvergiftungen eindeutig klären. Nach mehreren Tagen festgestellte Cyanwasserstoffwerte, besonders wenn sie lediglich im Mageninhalt bzw. im Blut in einer Konzentration von 100—800 µg % gefunden wurden, bedürfen einer besonders kritischen Würdigung, da sie sowohl postmortal entstanden sein als auch von einer Cyanwasserstoffvergiftung herrühren können.

An folgende Möglichkeiten der postmortalen Entstehung des Cyanwasserstoffes kann bei kritischer Betrachtung der Versuchsergebnisse gedacht werden:

1. durch chemische Reaktionen bzw. Zerfallsprozesse;
2. durch Bakterien oder Pilze.

Gegen die Annahme einer Entstehung des Cyanwasserstoffes durch einfache abakterielle autolytische Zerfallsprozesse sprechen die Beobachtungen, daß nicht unter sonst konstanten Versuchsbedingungen auch nur annähernd gleiche Ergebnisse erhalten wurden. Auch die Tatsache, daß der Cyanwasserstoff ausschließlich bei niedrigen Temperaturen gebildet wurde, stützt nicht die Annahme eines einfachen chemischen Zerfallsprozesses.

Dagegen sprechen das niedrige Temperaturoptimum, der annähernd gleichbleibende günstigste pH-Bereich, besonders aber der in zwei Fällen positiv verlaufene Versuch des Überimpfens von Pilzrasen für die Möglichkeit einer durch Pilze bedingten Entstehung. Ein direkter Nachweis durch Untersuchung von bisher insgesamt 30 reinen Pilzkulturen gelang jedoch noch nicht. Auch verschiedene Käsesorten mit Schimmelpilzrasen enthielten keinen Cyanwasserstoff.

Der Cyanwasserstoff selbst hemmt offenbar nicht zwangsläufig fermentativ konditionierte Zerfallsprozesse. Ein interessantes Analogon zu unserer Beobachtung ist das gleichfalls durch Wirkoptimum charakterisierte Phänomen der T-receptorbildenden Fermente.

Läßt man Blutproben längere Zeit im Eisschrank stehen, so entwickelt die bakterielle Flora eine lebhafte fermentative Tätigkeit, die zur Bildung des sog. „T-Receptors“ an den Blutkörperchen führt. Zahlreiche Bakterien haben diese Wirkung (FRIEDENREICHs M- und J-Stämme sowie sämtliche Vibrioenstämme, die CASELITZ untersuchte, usw.). Der Fermentierungsprozeß geht in der Wärme sehr rasch zu Ende, während sich sein Ablauf in der Kälte längere Zeit verfolgen läßt (CASELITZ). Schon THOMSEN beobachtete, daß das wirksame Prinzip verimpfbar ist und in der Kälte rascher angeht. Der Hübener-Thomsen-Friedenreichsche Fermentierungsprozeß durch Choleravibrionen und ebenso durch Kulturfiltrate von diesen, der neuerdings seine Parallele im Trypsintest der Blutgruppenserologie findet, scheint auch nicht durch Cyanide gehemmt zu werden (vgl. SPAET und OSTROM).

Es ist also denkbar, daß auch die von uns nachgewiesene postmortale Entstehung von Cyaniden den fermentativen Aufschluß von organischem Material des Mageninhaltes selbst offenbar in bestimmtem Rahmen nicht hemmt.

Literatur

- BOXER, G. E., and J. C. RICKARDS: Chemical determination of vitamin B₁₂. II. The quantitative isolation and colorimetric determination of millimicrogram quantities of cyanide. Arch. Biochem. **30**, 372 (1951).
- — Determination of thiocyanate in body fluids. Arch. Biochem. **39**, 292 (1952).
- CASELITZ, F. H.: Bedeutung und weitere Entwicklung der Haemagglutination nach THOMSEN. Ergebni. Hyg. Bakt. **28**, 286 (1954).
- FELDSTEIN, MILTON, and NIELS C. KLENDSHØJ: The determination of cyanide in biologic fluids by microdiffusion analysis. J. Lab. clin. Med. **44**, 166—170 (1954).
- FOWLER, R. C., and A. J. DURBETACKI: Cyanide and thiocyanate determination in multiple sclerosis and allied demyelinating disorders. Amer. J. Physiol. **171**, 724 (1952).
- FRIEDENREICH, V.: Fortgesetzte Untersuchungen über bakterielle Umformung der isoagglutinatorischen Verhältnisse der Blutkörperchen in vitro. Acta med. scand. **26**, 308 (1927).
- Untersuchungen über das von O. THOMSEN beschriebene vermehrungsfähige Agens als Veränderer des isoagglutinatorischen Verhaltens der roten Blutkörperchen. Z. Immun.-Forsch. **55**, 84 (1928).
- Die serologische Auffassung des Thomsenschen Blutkörperchenrezeptors. Acta path. microbiol. scand. Suppl. **5**, 68 (1930).
- GETTLER, A. O., and J. O. BAINE: The toxicology of cyanide. Amer. J. med. Sci. **195**, 182 (1938).
- , and L. GOLDBAUM: Detection and estimation of microquantities of cyanide. Analyt. Chem. **19**, 270 (1947).
- GOLDSTEIN, FRANZ, and FREDERIC RIEDERS: Conversion of thiocyanate to cyanide by an erythrocytic enzyme. Amer. J. Physiol. **173**, 287 (1953).
- HEGNAUER, R.: Die Verbreitung der Blausäure bei den Cormophyten. 2. Mitt. Die Cyanogenese in Genus *Taxus*. Pharm. Weekbl. **94**, 241—248 (1959). — 3. Mitt. Die blausäurehaltigen Gattungen. Pharm. Weekbl. **94**, 248—262 (1959).

- LANG, K.: Die Rhodanbildung im Tierkörper. Biochem. Z. **259**, 243 (1933).
- LINDAHL, O.: Zit. nach SCHÜTTE u. KIESOW 1955.
- SCHÜTTE, ERNST, u. LUTZ KIESOW: Blausäurebildung als Fehlerquelle bei der Chloridbestimmung nach VAN SLYKE. Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **302**, 96 (1955).
- SEIFERT, P.: Studien zur Cyankalium-Vergiftung mit Hilfe einer Testfleckenmethode. Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med. **41**, 441—450 (1952).
- SPAET, THEODORE, u. BETTY W. OSTROM: Studies on the normal serum pan-agglutinin active against trypsinated human erythrocytes. J. clin. Path. **5**, 4, 332 (1952).
- THOMSEN, O.: Ein vermehrungsfähiges Agens als Veränderer des isoagglutinatorischen Verhaltens der roten Blutkörperchen, eine bisher unbekannte Quelle der Fehlbestimmungen. Z. Immun.-Forsch. **52**, 85 (1927).

Dipl.-Chemiker A. BERNT,
Institut für gerichtliche Medizin der Humboldt-Universität,
Berlin N 4, Hannoversche Str. 6

G. SCHMIDT (Erlangen): Über die Spezifität der Zwikker-Reaktion beim Barbituratnachweis.

Unter den bekannten Reaktionen zum Barbituratnachweis ist die Zwikkersche Reaktion (1931) mit Kupfersulfat-Pyridin eine der ältesten. Sie gestattet ebenso wie die empfindlichere spektrophotometrische Untersuchung lediglich einen Gruppennachweis. Auch chromatographische Methoden können nicht immer die Unterscheidung einzelner Präparate ermöglichen, die aber in der forensischen und klinischen Praxis notwendig ist, damit aus dem chemischen Befund ein Rückschluß auf Herkunft und Giftigkeit des jeweiligen Barbiturates möglich wird. Die Mikrokristallbildungsreaktion mit Schwermetallhalogenreagentien nach LÜDY-TENGER (1944) ist bei der Identifizierung kleiner Barbituratmengen eine wesentliche Hilfe, aber es gibt für diese Reaktion eine ganze Reihe von Störsubstanzen, die ebenfalls Komplexe bilden, z. B. Sulfonamide, Purinkörper, Eiweißabbauprodukte.

Zur Sicherung des Identitätsnachweises war daher eine empfindliche Reaktion wünschenswert, die wir in der mikrochemischen Technik der Zwikkerschen Reaktion gefunden zu haben glauben. Es bilden sich nämlich kristallisierte Komplexe von typischer rosavioletter Farbe mit den meisten Barbituraten und von grüner Farbe mit den Thiobarbituraten, die auf Grund ihrer Form und ihrer kristalloptischen Eigenschaften gut zu unterscheiden sind.

Technik. Auf einen normalen Objektträger wird die Substanzprobe gebracht, wobei 10—20 μ genügen, wenn diese ziemlich rein vorliegt. Nach dem Zerreiben wird mit einem 0,01 ml großen Tropfen Zwikker-Reagens (4 ml einer 10%igen wäßrigen Kupfersulfatlösung, 1 ml Pyridin,