

Aus dem Institut für gerichtliche Medizin der Universität Wien
(Vorstand: Prof. Dr. W. SCHWARZACHER †)

Zur Methodik der ADH-Bestimmung

Von

G. MACHATA

Mit 1 Textabbildung

(Eingegangen am 15. März 1958)

Neben dem Widmark-Verfahren zur Blutalkoholbestimmung hat sich die enzymatische ADH-Methode sehr gut eingeführt. Grundlegende Arbeiten darüber stammen von BONNICHSEN und THEORELL; BÜCHER und REDETZKI; DOTZAUER, REDETZKI, JOHANNISMEIER und BÜCHER; REDETZKI und JOHANNISMEIER. Die wichtigsten Arbeitsverfahren sind in der Vorschrift des deutschen Bundesgesundheitsamtes (DOTZAUER) und der Vorschrift der Fa. Boehringer, Mannheim, niedergelegt.

Die Methode besteht in der enzymatischen Dehydrierung des Alkohols zu Acetaldehyd nach der vereinfachten Gleichung



Das Gleichgewicht liegt im alkalischen Bereich auf der rechten Seite der Gleichung und verläuft quantitativ beim Abfangen des entstehenden Acetaldehydes durch Semicarbazid. Der Arbeitsgang beginnt mit der Enteiweißung der Blut- oder Serumprobe mittels Perchlorsäure. Die gewonnene eiweißfreie Flüssigkeit wird mit den Fermenten Alkoholdehydrogenase (ADH), Diphosphopyridinnucleotid (DPN), einem alkalischen Puffer und Semicarbazid versetzt. Nach beendeter Reaktion wird der Umsatz durch die Absorptionsmessung des entstehenden DPNH_2 beim Maximum von 340 m μ bestimmt (optischer Test von WARBURG).

Bei der Ausführung des Verfahrens nach der einen oder der anderen Vorschrift ergeben sich jedoch noch immer Fehlermöglichkeiten, die nur durch eine detaillierte, bis in die letzten Einzelheiten gehende Arbeitsvorschrift zu beheben sind. Diese darf von vornherein keine Möglichkeit zur Variation offenlassen. Vergleicht man die genauen Richtlinien für die Widmark-Methode mit den kurz gefaßten ADH-Vorschriften, so tritt die Unzulänglichkeit letzterer zutage. Die folgenden Ausführungen — unter Berücksichtigung der genannten Vorschriften für die enzymatische Methode — sollen die Einführung der ADH-Methode erleichtern. Auch die apparative Ausstattung wird eingehend beschrieben, da ein komplettes, brauchbares Arbeitsgerät viel Ärger ersparen kann.

Die Arbeitsgeräte sind für einen Ansatz von etwa 25 Doppelbestimmungen und 6 Tests berechnet.

Glasgeräte:

1. Pipetten:

- 2 Vollpipetten zu 4 ml für Perchlorsäure und Puffer, eine Pipette zu 10 ml für Natronlauge. Die Spitzen sind angeschliffen.

Alle weiteren Pipetten sind keine Ausflußpipetten, sondern haben 2 Marken, die Spitzen sind etwa 40 mm ausgezogen und haben am ausgezogenen Teil 5 mm äußeren Durchmesser, Spitzen sind ebenfalls angeschliffen.

- 60 Stangenpipetten 0,1 ml für den Reaktionsansatz;

- 30 Stangenpipetten 0,5 ml für Blute und Tests;

- 2 Stangenpipetten 1,0 ml, graduert in 0,1 ml für die DPN-Lösung;

- 2 Stangenpipetten 0,2 ml, graduert in 0,02 ml für die ADH-Suspension;

- 2 Stangenpipetten 1,5 ml, graduert in 0,25 ml für die Alkoholttestlösungen;

- 2 Stangenpipetten 1,27 ml für Alkohol (oder Vollpipetten);

- 2 Vollpipetten 2,85 ml für DPN-Lösung.

Die Graduierung der Meßgeräte soll eichfähig sein. Die angeschliffenen Spitzen der Pipetten erleichtern das saubere Ausfließen an der Gefäßwandung, die ausgezogenen Spitzen ermöglichen das Einpipettieren in die Reaktionsröhrchen bei gleichzeitigem Ablesen der untersten Marke ohne Benetzung des Schliffbettes. Der äußere Durchmesser der Spitze ist bei der graduerten 1 ml-Pipette wegen der engen Öffnung des DPN-Gefäßes besonders zu beachten.

2. Meßkolben:

- 1 Meßkolben zu 300 ml für Puffer;

- 2 Meßkolben zu 100 ml für Perchlorsäure und Alkohol-Stammlösung;

- 2 Meßkölbchen zu 10 ml für Alkohol-Stammlösung nach der Glykokollester-Methode.

3. Reagensgläser:

- 60 Stück mit Glasschliffstopfen und Marke bei 5 ml werden benötigt. Stopfen und Röhrchen nummeriert.

Diese Röhrchen werden für die Enteiweißung und für den Bestimmungsansatz verwendet. Sie sind aus Jenaer Glas gefertigt, der äußere Durchmesser ist 13 mm, die Höhe (ohne Stopfen) beträgt 90 mm. Die Röhrchen lassen sich ohne Bruchgefahr in jeder Zentrifuge verwenden, die Ablesegenauigkeit an der Marke ist ausreichend (mindestens $\pm 0,5$ mm, das sind etwa $\pm 1\%$). Auch ist das Einpipettieren und Umschwenken bequem durchführbar.

Photometer. Es soll eine Messung der Extinktion bei 366 bzw. 340 $m\mu$ erlauben. Die Messung bei 340 $m\mu$ ist wegen der größeren Extinktion (steilere Eichgerade, größere Genauigkeit) unbedingt vorzuziehen. Die Ablesung der Extinktionsskala soll bei Werten über 0,20 auf mindestens 0,005 genau erfolgen, bei Werten darunter auf 0,002. Ein Gerät mit einem vielfachen Probenwechsler und ein Satz von 10 Glascuvetten zu 1 cm — Quarzcuvetten sind nicht notwendig — ist vorzuziehen, um rascheres Arbeiten zu ermöglichen. Es dürfen nur gepaarte Cuvettensätze ver-

wendet werden. Die Cuvetten müssen gleich hoch gefüllt werden, Streustrahlenschutzfilter (wenn vorhanden) sind einzuschalten, es darf nur bei warmem Gerät und konstantem Photostrom gemessen werden, die Außenseiten der Cuvetten sind jedesmal blank zu wischen u. a. (KORTÜM).

Reagentien:

Natriumpyrophosphat p. a. Merck (Art. Nr. 6591);

Semicarbazidhydrochlorid p. a. Merck (7722);

Glykokoll nach SÖRENSEN, Merck (4201);

Natronlauge 2 n, Merck (9136) oder Titrisol (9956);

Perchlorsäure (70 %) p. a. Merck (519);

Äthylalkohol, absol. Merck (972);

Alkohol-Standardlösungen Merck (8985);

Glykokolläthylester-chlorhydrat, Merck (893);

Spezial-Indicatorpapier 8,2—10,0, Merck (9558);

ferner die Originalpackungen ADH zur Blutalkoholbestimmung, Boehringer.

Vorbereitung der Reagenslösungen. Die in der Vorschrift des Bundesgesundheitsamtes angegebene Reinigung des Semicarbazides von Alkohol erübrigt sich bei der p. a.-Qualität der Substanz. Die l-normale Natronlauge (Titrisol) wird in der halben angegebenen Menge bidestilliertem Wasser gelöst und in gereinigten Polyäthylenflaschen aufbewahrt.

Zum Enteiweißen dient eine Lösung von 2,9 ml Perchlorsäure in 100 ml bidestilliertem Wasser (KLEIN).

Für die Pufferlösung werden

10 g Natriumpyrophosphat,

2,5 g Semicarbazidhydrochlorid und

0,5 g Glykokoll

eingewogen und in etwa 250 ml bidestilliertem Wasser unter Umschwenken gelöst (benötigt etwa 15—20 min). Sodann werden 10 ml 2-normale Natronlauge zugesetzt und auf 300 ml aufgefüllt. Der p_H -Wert soll etwa 8,7 betragen.

Zur Aufbewahrung der Perchlorsäure und des Puffers ist es zweckmäßiger Polyäthylenflaschen zu verwenden. Jedoch genügen auch Glasflaschen mit eingeschliffenen Stopfen. Die Lösungen sind ohne weiteres bei Zimmertemperatur haltbar und können außerhalb des Laboratoriums aufbewahrt werden.

Die ADH-Suspension wird vor Gebrauch leicht umgeschwenkt. Der Stopfen wird fest aufgesetzt, da die Lösung sonst herauskriecht und am Rande eintrocknet. Je ein Gläschen mit DPN wird vor Gebrauch mit 2,85 ml bidestilliertem Wasser versetzt (Vorsicht beim Öffnen, denn das Ferment stäubt leicht und bleibt auch am Stopfen haften), dann wird mit aufgesetztem Stopfen bis zur Lösung leicht geschüttelt. Beide Fermente werden im Eisschrank gut verschlossen aufbewahrt. Das gelöste DPN ist etwa 2 Wochen haltbar.

Bidestilliertes Wasser. Zur Ausführung der Bestimmung ist auf Grund eigener Erfahrung quarz-bidestilliertes Wasser nicht erforderlich. Auch in metallfreien Apparaturen gewonnenes destilliertes Wasser gab aus-

gezeichnete Resultate, da der Puffer allenfalls vorhandene Schwermetalle bindet. Wir empfehlen jedoch sicherheitshalber die Verwendung von bidestilliertem Wasser, z. B. aus einer Jenaer Glasapparatur. Selbstverständlich muß bei der ganzen Analyse auf alkohol- und aldehydfreie Raumluft geachtet werden. Mit solchem bidestilliertem Wasser wurden unsere gesamten Untersuchungen störungsfrei durchgeführt. Die gerade benötigte Menge an bidestilliertem Wasser wird in eine Spritzflasche aus Polyäthylen gefüllt.

Testalkohol. Zum Anlegen einer Eichgeraden müssen Alkoholstandardlösungen hergestellt werden. Nach den Angaben der zitierten Vorschriften stellt man sich eine 1%ige Alkohollösung durch Einwiegen bzw. Pipettieren von 1 g absolutem Alkohol auf 100 ml bidestilliertem Wasser her. Wir pipettieren 1,27 ml (1 g) absoluten Alkohol in ein teilweise mit bidestilliertem Wasser gefülltes Meßkölbchen und füllen rasch unter Abspritzen des Kolbenhalses bis zur 100 ml-Marke auf. Für die Eichkurve werden nun vielfache Mengen von 0,25 ml (von 0,25—1,50 ml) dieser 1%igen Lösung in die Röhrchen einpipettiert und bis zur 5 ml-Marke genau aufgefüllt. Die Verdünnungsreihe enthält dann 0,5 bis 3⁰/₁₀₀ Äthanol. Man erspart sich bei diesem Verfahren eigene Gefäße zum Verdünnen, die Röhrchen sind numeriert und können nicht verwechselt werden. Außerdem ermöglicht das Endvolumen von 5 ml ein genaueres Arbeiten, als ein Volumen von 2 ml bei zweimaligem Pipettieren, wie dies in den verschiedenen Vorschriften angegeben wird. Bei der Aufstellung zahlreicher Eichgeraden konnte auf diese Art niemals eine Abweichung festgestellt werden.

Die Verseifungsmethode mit Glykokollesterchlorhydrat liefert sehr exakte Werte. Für eine Routinebestimmung ist sie entbehrlich.

Zum Aufstellen der Eichgeraden ist diese Methode jedoch sehr zu empfehlen, besonders wenn keine frische Packung mit absolutem Alkohol vorrätig ist. Hierzu werden 303 mg des Esters in einem Meßkölbchen bis zur 10 ml-Marke mit 2 n-Natronlauge aufgefüllt und durch Umschwenken gelöst. Nach 35 min entsteht eine Lösung, die 1 Gew.-% Äthylalkohol enthält. Sie wird, wie oben beschrieben, in den Röhrchen zu einer Konzentrationsreihe verdünnt.

Gut geeignet sind die Alkohol-Testlösungen von Merck, von denen bei jedem Bestimmungsansatz 2—3 Ampullen verschiedener Konzentration mitgemessen werden, um das Arbeitsverfahren zu überprüfen*.

Vorbereitung des Untersuchungsmaterials. Da bei der ADH-Methode immerhin 1 ml Blut oder Serum benötigt wird, die Serummenge aber oft nicht ausreicht bzw. das Blut meist coaguliert und nur äußerst mühsam in die Pipette zu bringen ist, wird — einem Vorschlag von DETTLING entsprechend — die Lösung dieses Problems nur in der Homo-

* Eine Erweiterung der Konzentrationsreihe (0,8—1,9⁰/₁₀₀) bis auf 3,0⁰/₁₀₀ Alkohol wäre wünschenswert.

genisierung der Blutprobe gesehen. MUELLER schlägt vor, ausschließlich Serum zu untersuchen, um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten. Zu diesem Thema sei weiters auf die Versuche von LAVES mit Natriumfluorid-Blut und auf die Feststellungen von GRÜNER über den wechselnden Quotienten des Alkoholgehaltes von Serum zum Vollblut, der bei Bestimmungen in Leichenserum Anlaß zu erheblichen Fehlern sein kann, verwiesen.

Zum Homogenisieren von Proben in Eprouvetten oder Venülen sind zahlreiche Geräte im Handel, die hier allerdings nicht überall bekannt sind. Ungeeignet sind alle Geräte, die Luft in die Proben einrühren, d.h. starken Schaum erzeugen, der ebenfalls das Pipettieren erschwert und Fehler verursachen kann. Experimentell wurde Citratblut des öfteren mit gutem Ergebnis untersucht. Für die Praxis ist die Herstellung von Citratblut bei der Abnahme jedoch grundsätzlich abzulehnen, da sie erfahrungsgemäß nicht mit der nötigen Genauigkeit erfolgt. Auch hämolytisches Blut bedarf keiner weiteren Behandlung vor der Bearbeitung, nur muß man sich überzeugen, ob wirklich keine Coagula vorliegen. Ungerinnbar gemachtes Blut und hämolytisches Blut müssen daher vor Entnahme der Probe immer gründlich aufgeschüttelt werden. Die Entnahme einer Probenmenge von 1 ml bietet eine Gewähr dafür, daß ein Durchschnittswert erhalten wird, der bei der geringen Substanzmenge der Widmark-Methode nicht immer erreichbar ist.

Enteweißung. In den beschriebenen Röhrchen werden 4 ml Perchlorsäure (3,4%) einpipettiert und dann 0,5 ml Blut oder Serum zugegeben. Die Pipetten sind vor dem Einpipettieren außen abzuwischen. Von den Testalkoholproben werden ebenfalls 0,5 ml in die Perchlorsäure eingebracht. Die Stopfen werden aufgesetzt und die Röhrchen sofort nach Einbringen der Probe einzeln gründlich durchgeschüttelt. Wird mit dem Schütteln zugewartet, so bildet sich ein Blut- bzw. Eiweißklumpen am Boden des Röhrchens oder entlang der Gefäßwand. Diese Verklumpungen müssen dann mit einem Glasstab zerdrückt werden. Die Testproben werden nur einfach, die Blutproben doppelt angesetzt und letztere in einer Zentrifuge bei 3000 U/min 5 min zentrifugiert.

Sollte für eine Doppelbestimmung zu wenig Material vorhanden sein, so kann auch weniger als 0,5 ml eingesetzt werden, z.B. 0,3 und 0,2 ml Blut. Bei diesen Bestimmungen wird der Anteil des Enteweißungsansatzes durch 0,2 bzw. 0,3 ml Perchlorsäure ergänzt. Das erhaltene Resultat muß dann dementsprechend umgerechnet werden (Tabelle 2).

Der *Bestimmungsansatz* erfolgt entweder durch genaues Pipettieren der Reagentien und Proben zu einer Gesamtmenge von 5 ml, oder vorteilhafter, in geeichten 5 ml-Röhrchen. Es werden etwa 4 ml Pufferlösung einpipettiert, darnach 0,1 ml DPN-Lösung (mittels der 1 ml-

graduierten Pipette mit 0,1 ml-Teilung, von Röhren zu Röhren gehend) zugegeben, die Röhren umgesenkt und nun exakt 0,1 ml des Enteiweißungsansatzes zugefügt. Bei dem gleichzeitig angesetzten Reagentienblindwert wird statt dessen 0,1 ml Perchlorsäure eingebracht. Beim Zentrifugieren setzt sich ein Teil des gefällten Eiweißes ab, ein erheblicher Teil rahmt auf. Um nun ein Einbringen dieser Partikel in den Ansatz zu vermeiden — sie stören beim Photometrieren —, muß die 0,1 ml-Pipette mit dem Finger oben verschlossen vorsichtig in die Mitte des Ansatzes eingetaucht und aufgesaugt werden. Die Pipette wird außen von den anhaftenden Teilchen abgewischt (Filtrierpapier), dann an der Gefäßwand durch Abfließenlassen genau bis zur oberen Marke eingestellt und die Probe in den Bestimmungsansatz eingebracht. Für die klaren Testalkohole ist das Zentrifugieren und der beschriebene Pipettiervorgang nicht nötig. Man läßt die Pipetten durch Anlegen an den inneren Rand des Röhrens unterhalb des Schliffhalses bis zur zweiten Marke abfließen. Die Probe wird etwas umgeschwenkt und dann 0,02 ml ADH-Suspension (0,2 ml-Pipette zu 0,02 ml graduiert) von Röhren zu Röhren gehend eingebracht. Zuletzt füllt man mit Pufferlösung genau bis zur Marke auf.

Die Röhren werden gut verschlossen und durch mehrfaches Umdrehen (nicht schütteln!) gemischt. Sollte durch starkes Schütteln im Ansatz Schaum entstanden sein, ist die Probe zu verwerfen, da der Schaum das Fermenteiweiß denaturiert.

Die Röhren bleiben nun 70 min bei Temperaturen zwischen 21 und 26° stehen. Das Maximum der Extinktion wird bei einer Alkohol-Konzentration von 1,3 ‰ schon nach 20 min, bei 1,7 ‰ schon nach 45 min erreicht. Die Extinktion bleibt dann bei 25° etwa 2 Std konstant und sinkt schließlich langsam ab. Die Messung soll am besten nach 70 min begonnen werden und 120 min nach Beginn der Reaktion beendet sein. Es empfiehlt sich, immer die als Optimum angegebene Temperatur von 25° einzuhalten, und zwar durch Einstellen in den Brutschrank oder durch Einstellen in ein auf 25° temperiertes Wasser in einem großen Gefäß mit Röhreneinsätzen (z.B. Gefäß für Eintauchrefraktometer).

Zur Überprüfung des Blindwertes wird dieser vorerst gegen bidestilliertes Wasser im Photometer gemessen. Der Blindwert verbleibt dann im Probenwechsler und jeweils 3 Cuvetten werden mit den Reaktionsansätzen gefüllt und nacheinander gemessen. Die Cuvetten werden dann mit bidestilliertem Wasser gespült und umgekehrt auf Filtrierpapier zum Abrinnen aufgestellt. Die ersten 3 Cuvetten sind dann, absolute Fettfreiheit vorausgesetzt, nach Messung der anderen 6 Proben wieder benutzbar oder werden, falls noch Tröpfchen anhaften, zuerst mit einem

Teil der Probe (1—2mal mit etwa 1 ml) gespült. Für die üblichen Cuvetten reichen etwa 3 ml Flüssigkeit.

Auch bei quartz-bidestilliertem Wasser war die Extinktion des Blindwertes nicht unter 0,04 (bei 366 m μ) bzw. 0,07 (bei 340 m μ) zu bringen. Üblicherweise erhält man bei frisch angesetzten Lösungen als Blindwert 0,04—0,05 (mit glas-bidestilliertem Wasser). Auch nach einem Monat Lagerzeit der Reagentien bei Zimmertemperatur wurden nur Werte von 0,07—0,08 (bei 340 m μ 0,12—0,14) gefunden. Die Extinktion des Blindwertes soll nach den bestehenden Vorschriften bei 366 m μ nicht größer als 0,10 sein, bei 340 m μ daher nicht mehr als 0,18.

Die Auswertung der für die Proben erhaltenen Extinktionen erfolgt an Hand der Eichkurve. Für Serumproben ist das Ergebnis durch 1,236 zu dividieren (ELBEL), da das spezifische Gewicht des Serums für

Tabelle 1. *Extinktionswerte für die Eichgeraden*

Alkohol (% ₁₀₀)ig	380 m μ	366 m μ	340 m μ
0,5	0,030	0,078	0,14
1,0	0,058	0,155	0,28
1,5	0,087	0,235	0,415
2,0	0,114	0,307	0,55
2,5	0,143	0,385	0,69
3,0	0,170	0,46	0,83

Tabelle 2. *Muster eines Analysenvordruckes*

Datum: 18. 3. 57	Ent- eisel- lung	Ansatz	E ₃₄₀	Wert	Korri- giert	Bemerkungen
Blindwert	—	36	0,095			gg. Wasser
Tests: Merck Amp. { 0,5	50	43	0,138			
{ 1,0	11	41	0,280			
{ 1,5	4	1	0,42			
Alkohol-Stammlösung { 2,0	8	19	0,555			
{ 2,5	13	26	0,685			
{ 3,0	45	2	0,835			
Klein, Erich {	38	42	0,247	0,87		Widmark 0,92
hämolytisches Blut {	15	12	0,240	0,85		
Bieleck, Gerhard, Blut { 0,5	46	44	0,555	2,00		Widmark 2,01
{ 0,2	6	5	0,221	0,79	1,98	
Wurm, Gottfried, Serum {	14	3	0,050	0,17	0,14	
{	16	18	0,050	0,17	0,14	

die Berechnung in Gew.-% berücksichtigt werden muß ($1,2 \times 1,03$). Praktisch wird auch der Wert 1,25 verwendet. Eine Eichgerade für Serum erhält man durch Verlegung des höchsten Wertes von 3%₁₀₀ Blut-

alkohol auf $2,4^0_{00}$, wobei die Ordinatenhöhe beibehalten und eine Gerade durch den Ursprung gezogen wird.

Die unter Berücksichtigung dieser Ausführungen erhaltenen Werte und die daraus resultierende Eichgerade sind angeführt. Die Ergebnisse sollten unseres Erachtens durch Verwendung anderer Geräte (Photometer, Pipetten, Reaktionstemperatur u. a.) nur geringfügig beeinflusst werden. Die Anfertigung einer eigenen Eichgeraden ist jedoch unerlässlich.

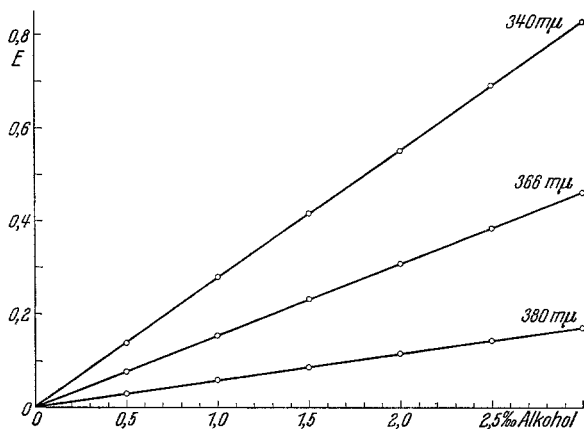


Abb. 1. Alkohol-Eichgerade zur Blutalkoholbestimmung nach dem ADH-Verfahren. Zeiss M4 QI Filter 2

Interessehalber ist in der Abbildung auch die Eichgerade bei einer Wellenlänge von $380\text{ m}\mu$ eingezeichnet. Der Quotient E_{366}/E_{340} wurde aus zahlreichen Messungen ebenso wie von REDETZKI und JOHANNSEMEIER zu $0,565$ bestimmt. Der Quotient E_{380}/E_{366} beträgt $0,37$, d.h. daß die Extinktion bei $380\text{ m}\mu$ um 63% geringer ist als bei $366\text{ m}\mu$. Ein Fehler in der Extinktionsablesung von $0,005$ bedeutet etwa $0,1^0_{00}$ Alkohol. Der gleiche Ablesefehler entspricht bei $366\text{ m}\mu$ $0,035^0_{00}$ und bei $340\text{ m}\mu$ etwa $0,02^0_{00}$ Alkohol absolut. Deshalb wird eine Messung bei $380\text{ m}\mu$ abgelehnt; der ganze Aufwand an Exaktheit würde damit hinfällig werden.

Zur Reinigung der Glasgeräte und Pipetten wird konzentrierte Schwefelsäure mit Zusätzen von je $0,5\%$ Natriumchlorat und Natriumnitrat verwendet (DOTZAUER). Bei Reinigung mit Bichromat-Schwefelsäure müssen die Geräte wesentlich gründlicher gespült werden, um die an die Glasoberfläche stark adsorbierten Chromionen zu entfernen. Es wird mit Wasser, destilliertem Wasser und schließlich mit bidestilliertem Wasser gespült. Anschließend wird in staubfreier Luft bei mäßiger Temperatur gestrocknet bzw. an der Wasserstrahlpumpe trockengesaugt.

Für die Fermente sind die vom Hersteller angegebenen Lagerhinweise zu beachten (Verfallsdatum, Lagern im Kühlschrank). Von einer Aktivitätsprüfung der ADH kann abgesehen werden, da die Herstellerfirma das Verfallsdatum mit ausreichender Sicherheitsgrenze angibt und festgestellt wurde, daß auch 2 Monate nach Ablauf des Verfallsdatums brauchbare Resultate erzielt werden konnten. Außerdem dürfte es bei einigem Anfall von Analysen kaum zur Erreichung des Ablaufdatums kommen. Eine Packung der Fermente genügt für etwa 50 Ansätze. Das Gesagte gilt auch für die Reinheitsprüfung des DPN, die vielfach gefordert wird. Auch hier sollte man sich streng an die zweiwöchige maximale Lagerzeit der DPN-Lösung halten (Kühlschrank). Es genügt, zur Prüfung einen hochpromilligen Testalkohol (etwa 30/100) im Bestimmungsansatz mitlaufen zu lassen, um die ausreichende DPN-Menge an der Geradlinigkeit der Eichkurve zu überprüfen.

Für die Analysen haben sich Vordrucke in der abgebildeten Art sehr bewährt, sie können später geheftet werden oder man läßt sich gleich ein entsprechendes Heft binden (Tabelle 2).

Bei Parallelbestimmungen wird eine Differenz von 3 Relativprozent noch als durchaus tragbar angesehen. Dieser Wert wurde bis jetzt noch nicht überschritten.

Über den zeitlichen Aufwand bei der ADH-Methode kann folgendes gesagt werden: Für einen Ansatz von 12 Proben (doppelt) und 6 Tests (Eichgerade) sowie einem Blindwert werden, fertige Lösungen vorausgesetzt, nicht mehr als 3—4 Std benötigt; dabei sind die 70 min Wartezeit, sowie die Bereitung der 1%igen Alkoholstammlösung und der entsprechenden Verdünnungen inbegriffen.

Zusammenfassung

Die praktische Durchführung der ADH-Methode zur Blutalkoholbestimmung wird an Hand genauer Richtlinien erörtert. Diese lassen keine Variation zu, berücksichtigen die Fehlermöglichkeiten des Verfahrens und bringen die vollständige Beschreibung der Arbeitsgeräte.

Bei Einhaltung dieser Richtlinien kann erwartet werden, daß die ADH-Methode einwandfreie Resultate liefert, die auch bei verschiedenen Laboratorien übereinstimmen.

Literatur

BONNICHSEN, R. K., and H. THEORELL: An enzymatic method for the microdetermination of ethanol. *Scand. J. clin. Lab. Invest.* **3**, 58 (1951). — BÜCHER, TH., u. H. REDETZKI: Eine spezifische photometrische Bestimmung von Äthylalkohol auf fermentativem Wege. *Klin. Wschr.* **1951**, 615. — DETTLING, J.: IX. Kongr. der Intern. Akad. für gerichtliche und soziale Medizin, Genua Oktober 1955. *Zit.: Der Straßenverkehrsunfall.* LAVES u. a. — DOTZAUER, G., H. REDETZKI,

K. JOHANNISMEIER u. TH. BÜCHER: Erprobung einer spezifischen Fermentmethode zur Mikrobestimmung von Äthylalkohol. Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med. **41**, 15 (1952). — ELBEL, H.: Die wissenschaftlichen Grundlagen der Beurteilung von Blutalkoholbefunden, 2. Aufl. Stuttgart: Georg Thieme 1956. — GRÜNER, O.: Die Verteilung des Alkohols im Blut. Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med. **46**, 10 (1957). — KLEIN, H.: Kurze Bemerkung zur Alkoholdehydrasemethode. Kongr. Dtsch. Ges. für gerichtl. Med., Bonn, 1953. Ref. Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med. **43**, 95 (1954). — KORTÜM, G.: Kolorimetrie, Photometrie und Spektrometrie, 3. Aufl. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1955. — LAVES, W., F. BITZEL u. E. BERGER: Der Straßenverkehrsunfall. Stuttgart: Ferdinand Enke 1956. — MUELLER, B.: Methodik und forensische Bewertung bei Blutalkoholbestimmung. Vortr. auf der Arbeitstag des Bundeskriminalamtes, Wiesbaden, 1957. — REDETZKI, H., u. K. JOHANNISMEIER: Grundlagen und Ergebnisse der enzymatischen Äthylalkoholbestimmung. Arch. Toxikol. **16**, 73 (1956). — WARBURG, O.: Wasserstoffübertragende Fermente. Berlin: Saenger 1948. — WIDMARK, E. M. P.: Die theoretischen Grundlagen und die praktische Verwendbarkeit der gerichtsmedizinischen Alkoholbestimmung. Berlin u. Wien: Urban & Schwarzenberg 1932.

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