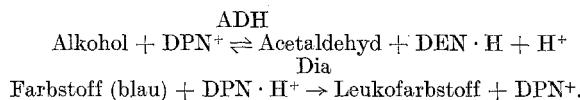


G. MACHATA (Wien): Die Diaphorasemethode zur Blutalkoholbestimmung. (Mit 1 Textabbildung.)

Mit der Widmark- und ADH-Methode zur Blutalkoholbestimmung besitzt die gerichtliche Medizin zwei analytische Verfahren, die unbestreitbar zu den besten mikrochemischen Methoden gehören. Nachdem bereits vom Widmark-Verfahren zahlreiche Modifikationen existieren, waren auch Abänderungen der ADH-Methode zu erwarten. Neben der schwedischen ADH-Methode, die sich zur Bestimmung des Blutalkoholgehaltes der Messung der Reaktionskinetik bedient, besitzt das Verfahren von ALHA Bedeutung, der die Enteiweißung durch eine Isothermdestillation im Widmark-Kölbchen umgeht. Daneben beansprucht noch die sog. Diaphorasemethode einige Beachtung.

Diaphorase wird aus Clostridium kluyveri oder Schweineherzen gewonnen und ist in entsprechend gepufferten Lösungen imstande, Wasserstoff auf Redoxfarbstoffe zu übertragen. Schon THUNBERG (HOLMBERG) führte Redoxfarbstoffe wie Methylenblau zur Erkennung der Wasserstoff übertragenden Fermente in die Biochemie ein. Er arbeitete aber, um dem Einfluß des Sauerstoffes zu entgehen — der die Rückbildung des Farbstoffes bewirkt —, in Stickstoffatmosphäre.

Bei der Diaphorasemethode zur Bestimmung der Blutalkoholkonzentration wirken nun 3 Fermente zusammen. Nach der angegebenen Reaktionsgleichung reduziert das entstehende DPNH unter dem Ein-



fluß der Diaphorase einen zugesetzten Redoxfarbstoff, wie Dichlorphenolindophenol zum Leukofarbstoff. Die Schwächung des Farbstoffes erreicht dabei einen Maximalwert und geht dann unter Einfluß des Luftsauerstoffes wieder zurück. Diese Schwächung der Farbintensität ist proportional dem Alkoholgehalt. Die Vorteile dieser Methode sind ins Auge fallend. Reaktionskinetisch läuft dieser Vorgang rascher als beim normalen ADH-Verfahren ab, weil das DPNH laufend entfernt und DPN rückgebildet wird.

Die Messung erfolgt beim Intensitätsmaximum des blauen Farbstoffes bei 600 nm im sichtbaren Bereich und benötigt deshalb kein Quarzspektrophotometer mehr, im Prinzip könnte auch ein einfaches Filterphotometer mit einer Glühlampe als Lichtquelle genügen. Die Enteiweißung ist umgehbar, da eine starke UV-Absorption des Eiweißes in diesem Spektralbereich nicht mehr vorhanden ist und außerdem der rote Blutfarbstoff nicht stört. Die einzige Veröffentlichung über diese

Methode stammt von TELLER, von der Firma Worthington Biochemical Corporation, die auch gebrauchsfertige Reagentien und Fermentsätze herstellt und vertreibt. Von ihm wird die Verwendung von Diaphorase und einem Redoxfarbstoff auch für andere Wasserstoff übertragende Fermentsysteme vorgeschlagen (z. B. Milchsäure → Brenztraubensäure), um die Messung im UV-Bereich zu ersetzen.

Wir haben nun wegen der angedeuteten, zu erwartenden Vorteile die Methode auf ihre Brauchbarkeit in der gerichtsmedizinischen Praxis näher überprüft. Die erste Schwierigkeit ergab sich schon im Preis der Fermente: Ein Satz, für 5 Bestimmungen ausreichend, kostet 17,50 Dollar und kann durchaus nicht als billig angesehen werden. In dankenswerter Weise wurde uns von der Firma Boehringer, Mannheim (Herrn Dr. BERGMEYER), Diaphorase in Ammonsulfat-Suspension zur Verfügung gestellt; der Preis von 1 mg Diaphorase würde sich bei der Firma Boehringer auf etwa DM 4,— stellen.

Die Bestimmungen wurden wie folgt durchgeführt: Blute bzw. Sera wurden 1:100 verdünnt und die Verdünnungen entweder mit 0,1%igem Ammoniak, physiologischer Kochsalzlösung oder Boratpuffer (pH 9,3) vorgenommen. In der Originalvorschrift von TELLER wird physiologische Kochsalzlösung zur Verdünnung verwendet. Bei unseren Versuchen hat sich die alkalische Pufferlösung oder noch einfacher das verdünnte Ammoniak als vorteilhafter erwiesen, da eine vollständige Hämolyse zu einer klaren Lösung eintritt und Abzentrifugieren der Zellen nicht nötig ist.

Der Reagensatz enthielt auf je 3 ml Lösung 1 mg ADH, 1 mg DPN und 0,5 mg Diaphorase in Boratpuffer (pH 9,3), ferner die Farbstofflösung (Dichlorphenolindophenol) mit einer Extinktion von etwa 0,5 für 1 cm Schichtdicke. Alle Reagentien wurden in der benötigten Menge zusammen in einem Gefäß gelöst und nach vorsichtigem Umschwenken nach 15 min Wartezeit verwendet. Die Reaktion erfolgte zweckmäßig gleich in der Cuvette, die mit einem Falzdeckel versehen sein muß, um das Umschwenken zu ermöglichen.

Reagentien. Blute oder Seren 1:100 verdünnt (0,1% Ammoniak oder 0,85% Kochsalzlösung oder Boratpuffer pH 9,3).

1 mg ADH	{	gelöst in
1 mg DPN		
0,5 mg Diaphorase		

Farbstoff E 1 cm ~ 0,5

Ansatz: 3 ml Reagenslösung + 0,1 ml verdünnte Probe.

3 ml des Reagensatzes wurden nun in der 1-cm-Cuvette mit 0,1 ml der verdünnten Blut-, Sera- oder Testlösungen versetzt, bei aufgesetztem Falzdeckel vorsichtig umgeschwenkt und die Abnahme der Extinktion gegen einen Vergleich von reinem Wasser in einem Doppelstrahlspektrophotometer registrierend verfolgt. Der Leerwert wird durch Aufnahme des Ansatzes nach Zufügen von 0,1 ml verdünntem Ammoniak, physiologischer Kochsalzlösung oder Boratpuffer auf gleiche Art wie beschrieben erhalten. Das Spektralphotometer wird dabei auf 600 nm eingestellt und der Papiervorschub ohne Kuppelung mit der Wellenlängeneinteilung laufen gelassen. Die Extinktionsänderung erscheint dann auf dem Papier in der Abhängigkeit von der Zeit (Abb. 1).

Bei manchen Doppelstrahlgeräten ist nun zu beachten, daß der Lichtstrahl die Cuvetten 2mal passiert und damit die 1-cm-Cuvetten 2 cm effektiver Schichtlänge entsprechen. Kompensierende Photometer (Einstrahlgeräte) dürften zur Messung nicht gut geeignet sein, da die Extinktionsänderung damit nur schwer verfolgbar ist. Die Ablesung bei direkt anzeigen den Geräten erfordert die ständige Aufmerksamkeit des Bedienenden, um das Minimum der Extinktion zu erkennen. Aus Abb. 1 ist ersichtlich, daß der Minimalwert nach etwa 2 min erreicht wird, danach steigt die Extinktion wieder an. Nach ungefähr 15—30 min verläuft die Kurve wieder gerade, und die Lösung in der Cuvette könnte erneut zur nächsten Bestimmung (nach Festlegung des Leerwertes) verwendet werden.

Wir fanden nun, daß eine Übereinstimmung mit den Blutalkoholwerten, die nach der Widmark- und ADH-Methode gewonnen wurden, nicht zu erzielen war. Es gelang auch nicht, mit Testproben eine Eichgerade herzustellen, da die Werte stark streuten.

In der Literatur (TELLER) wird als Extinktionsdifferenz für 0,1% Alkohol 0,008 angegeben. Dieser Wert ist bereits unter der erzielbaren Genauigkeit der meisten Photometer (KORTÜM), weshalb auch bei der ADH-Methode eine möglichst steile Eichgerade durch eine Messung bei 340 nm gefordert werden muß (MACHATA).

Wir sind der Ansicht, daß durch die Einführung eines dritten Fermentes sowie eines empfindlichen Redox-Indicators das gesamte System zu unübersichtlich wird, vor allem da sich nun auch der Sauerstoff der Luft an der Reaktion beteiligt und zur Rückreaktion (Oxydation des Leukofarbstoffes zum Farbstoff) beiträgt.

Der Zeitbedarf für die Durchführung der Bestimmung ist für 10 Analysen etwa 1 Std. Bei der Messung muß ständig der Ausschlag am Photometer beobachtet werden, selbst beim registrierenden Photometer ist ständige Anwesenheit erforderlich.

Aus diesen angeführten Gründen ist die Diaphorasemethode in der vorgeschlagenen Arbeitstechnik der klassischen ADH-Methode für die praktische Anwendung nicht überlegen, sondern zeigt sogar erhebliche Nachteile.

Zusammenfassung

Durch Einführung eines neuen zusätzlichen Fermentes — Diaphorase — zur enzymatischen Blutalkoholbestimmung gelingt es, statt des optischen Testes im UV-Bereich einen Redoxfarbstoff konzentrationsabhängig vom Alkoholgehalt zu verändern und damit die optische Messung in den sichtbaren Spektralbereich zu verlegen. Die angestellten

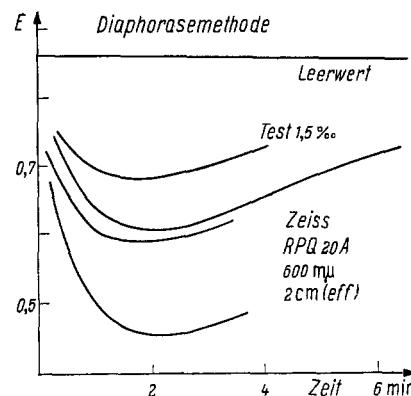


Abb. 1. Extinktionsänderung mit der Zeit von Leerwert, Test und 3 Proben

Untersuchungen ergaben jedoch eine geringe Genauigkeit der Methode, so daß sie in keinem Falle imstande ist, die ADH-Methode zu ersetzen.

Literatur

- ALHA, A., u. V. TAMMINEN: Modification of the ADH-method in the determination of blood alcohol. Ann. Med. exp. Fenn. **38**, 121 (1960).
- HOLMBERG, C. G.: Allgemeines über Wirkungsbestimmungen; Acceptormethode. Die Methoden der Fermentforschung, Bd. III, S. 2279. Leipzig: Georg Thieme 1941.
- KORTÜM, G.: Kolorimetrie, Photometrie und Spektrometrie, 3. Aufl. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1955.
- MACHATA, G.: Zur Methodik der ADH-Bestimmung. Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med. **48**, 26 (1958).
- TELLER, J. D.: Colorimetric enzymatic determination of ethanol. Abstracts of Papers; 134th meeting. Amer. chem. Soc., p. 64C.

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

H. SCHWEITZER (Düsseldorf) und F. BURKHARDT (Essen): Wahrnehmungsstörungen bei geringen Blutalkoholkonzentrationen. (Mit 2 Textabbildungen.)

Tachistoskopische Versuchsanordnungen zur Prüfung der optischen Wahrnehmung bieten ideale Möglichkeiten, durch kurzzeitige und konstante Reizdarbietungen die optische Wahrnehmungsfähigkeit zu überprüfen. Sie sind seit kurzer Zeit fester Bestandteil der Eignungsuntersuchungen von Kraftfahrern geworden.

Im Rahmen eines Forschungsauftrages des Verkehrsministeriums NRW, in dem die Frage der Beurteilung der Beeinträchtigung der Verkehrssicherheit durch niedere Blutalkoholkonzentrationen zu untersuchen war, wandten wir u. a. tachistoskopische Untersuchungen an.

Es bedarf keiner besonderen Ausführungen darüber, daß es sich um eine zusammengesetzte Leistung handelt, deren faktorielle Struktur wir nur mutmaßlich erfassen können. Es soll neben der Sehschärfe und der Adaptationsfähigkeit auch die konzentратiven Zuwendung geprüft werden können; außerdem beeinflussen jedoch noch eine Reihe anderer „höherer“ Wahrnehmungsfunktionen die Untersuchungsergebnisse. Eine gewisse visuelle Merkfähigkeit und eine persönliche Einstellungskonstante, durch die es zu falschen Antworten kommen kann und die die individuelle Genauigkeit der Wahrnehmung charakterisiert, muß besonders in Be tracht gezogen werden.

Es wurden Farbdiapositive von Verkehrssituationen, wie sie in einer westdeutschen Großstadt zur Mittagszeit vorkommen, hergestellt. Aus diesen Bildern wurden diejenigen ausgewählt, die möglichst klar strukturiert waren. In Vorversuchen mit nüchternen Personen wurden die Diapositive nach den häufigsten Antwortmöglichkeiten, wobei Größe,