

Aus dem Hygienischen Institut der Medizinischen Universität Budapest
(Direktor: Dozent Dr. VEDRES ISTVÁN)

Neue mikrochemische Methode für die Bestimmung des Blutmethylalkohols

Von

Dr. SUJBERT LÁSZLÓ

Technische Assistentin: KERTAY CECILIA

Mit 1 Textabbildung

(Eingegangen am 14. Juni 1964)

Bei den toxicologischen Untersuchungen strebt man nach der Ausarbeitung der „Mikro-“ und „Ultramikro“-Methoden. Außerdem besteht eine Tendenz, genauere, einfachere, kürzere Verfahren auszuarbeiten^{1,2}. Unter Berücksichtigung der vorerwähnten Standpunkte wurde eine neue mikrochemische Methode von mir ausgearbeitet, die auf dem Verfahren nach BREMANIS beruht³.

Das Prinzip der Methode: Das Blutmethylalkohol wird direkt im säuerlichen Milieu durch Kaliumpermanganat-Lösung zu Formaldehyd oxydiert^{2,4-10}. Dann wird das Formaldehyd durch die violette-rosarote Färbung photometriert³.

Die Meßgenauigkeit der Methode beträgt $\pm 10\%$.

Die notwendige Reagentien: 20%ige Phosphorsäure-Lösung; 1,5%ige Kaliumpermanganat-Lösung; 10%ige Natriumsulfit-Lösung (jeden Tag muß man es frisch bereiten). 0,5%ige Chromotropsäure-Lösung (jeden Tag muß man es frisch bereiten). 81%ige Schwefelsäure-Lösung (sie werden durch die vorsichtige Vermischung von 1 Vol. dest. Wasser und 3 Vol. cc. Schwefelsäure p. a. bereitet).

Der Gang der Bestimmung

0,02 ml Blut und 0,40 ml dest. Wasser werden in einem Wassermannrohr pipettiert. Die Lösung wird zusammengeschüttelt. 0,20 ml 20%ige Phosphorsäure und 0,20 ml 1,5%ige Kaliumpermanganat-Lösung werden dazugegeben. Die Test-Lösung wird 10 min lang auf Zimmertemperatur stehengelassen. Dann wird die Kaliumpermanganat-Lösung durch 0,20 ml 10%ige Natriumsulfit-Lösung entfärbt. Zur farblosen Lösung werden 1,0 ml 0,5%ige Chromotropsäure-Lösung und 81%ige Schwefelsäure hinzugegeben. Das Wassermannrohr wird in ein Wasserbad 60°C gestellt. In 20 min wird die Test-Lösung 45 min lang auf Zimmertemperatur gehalten. Ähnlicherweise wird die Kontroll-Lösung behandelt und durch methanolfreies Blut vorbereitet. Nach 45 min wird die

Färbung bei der Wellenlänge 578 m μ im Vergleich zur Kontroll-Lösung durch einen „Uvifot“-Photometer („MOM“) photometriert. Man kann auch einen Pulfrich-Stufenphotometer benützen. In diesem Fall muß ein Filter S 57 und eine Küvette von 10 mm Durchmesser verwendet werden.

Der Methylalkoholgehalt wird mit Hilfe der Eichkurve und Formel gerechnet.

Die Vorbereitung der Eichkurve

In Kenntnis des Wasserraumes des Körpers und der toxikologischen Dosen des Methylalkohols wird wäßrige Verdünnung durch den konzentrierten Methylalkohol vorbereitet^{11,12}. Blutmethylalkohol-Verdünnungs-

reihe werden durch die wäßrige Verdünnung mit einer Grenze von 1—50 $\mu\text{g}/0,02 \text{ ml}$ bereitst. Die Bestimmung muß nach „der Gang der Bestimmung“ verfahren.

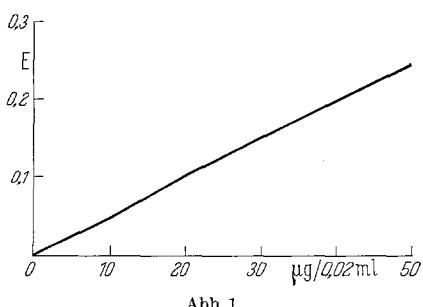


Abb. 1

Die Berechnung des Blutmethylalkohols

Die Berechnung geschieht nach der Formel $m = k \cdot c_m$, wo:

m = Blutmethylalkohol in mg/ml; k = konstans = 50/50; c_m = auf der Eichkurve abgelesene Methylalkohol in $\mu\text{g}/0,02 \text{ ml}$.

Beispiel: Auf der Eichkurve abgelesene Methylalkohol in $\mu\text{g}/0,02 \text{ ml}$ (c_m) = 20 $\mu\text{g}/0,02 \text{ ml}$; konstans (k) = 50/50; Blutmethylalkohol in mg/ml (m) = $k \cdot c_m$ = 50/50 · 20 $\mu\text{g}/0,02 \text{ ml}$ = 1000 $\mu\text{g}/1 \text{ ml}$ = 1 mg/ml.

Experimenteller Teil

Die optimalen Bedingungen der Methylalkoholoxydation und die Meßgenauigkeit der Methode wurden durch „in vitro“-Experimente untersucht. Die Experimenten wurden mit den 2,38 $\mu\text{g}/0,02 \text{ ml}$ und 14,28 $\mu\text{g}/0,02 \text{ ml}$ Methanol-Wasser und Methanol-Blut-Lösungen ausgeführt und die Färbung kolorimetriert.

In jedem Falle wurde es durch 20%ige Phosphorsäure gesäuert⁵. 1,5-, 3- und 5%ige Kaliumpermanganat-Lösungen wurden zur Oxydation verwendet^{2,4-10}. Das Stufen der Oxydation wurde nach 5, 10 und 15 min geprüft. 5-, 10- und 20%ige Oxalsäure sowie 10—20%ige Natriumsulfit-Lösungen wurden nach der Oxydation für die Entfärbung des Kaliumpermanganats angewendet^{2,4-10}. Auf Grund der Versuchsergebnisse der „in vitro“ Experimente muß 0,20 ml 20%ige Phosphorsäure 0,20 ml 1,5%ige Kaliumpermanganat-Lösung bei 5—10 min

Oxydationszeit 0,20 ml 10%ige Natriumsulfit-Lösung für die Oxydation verwendet werden.

Die Meßgenauigkeit der Methode wurde während der Aufnahme der Eichkurve bestimmt. Die Meßgenauigkeit beträgt $\pm 10\%$. Minimal kann man 1,30 μg Methanol in 0,02 ml Blut bestimmen.

„In vivo“ Experimente wurden zuerst an 3 Hasen ausgeführt. Die Hasen ließ man 12—14 Std lang hungern. Dann wurde wäßrige Methanol-Lösung peroral dosiert. In den ersten 6 Std wurde das Blut aus den Ohrenvenen ständig entnommen und der Blutmethylalkohol durch die neue Methode determiniert (s. Tabelle 1).

Tabelle 1. *Hasenexperiment I*

Das Gewicht des Versuchs- tieres g	Das Gewicht des dosierten konzen- trierten Methyl- alkohols g/10 ml	Der Zeitpunkt der Blut- entnahme Std	Der Blutmethyl- alkoholgehalt des untersuchten Blutes in g	
			Oxydationszeit	
			5 min	10 min
2620	0,38	1.	—	0,18
		4.	0,34	0,38
		6.	0,25	0,36
2700	0,38	2.	0,30	0,30
		3.	0,34	0,36
		4.	0,34	0,38
3540	Kontrolltier	1/4	—	—

Tabelle 2. *Hasenexperiment II*

Das Gewicht des Versuchs- tieres g	Das Gewicht des dosierten konzen- trierten Methyl- alkohols g/ml	Der Blutmethyl- alkoholgehalt des untersuchten Blutes in g		Erklärung	
		Oxydationszeit			
		5 min	10 min		
2720	0,38/10	0,28	0,36	Der dosierte Methylalkohol entspricht 10 g/70 kg	
2790	0,38/10	0,30	0,34		
3525	Kontrolltier	—	—	10 ml dest. Wasser wurde peroral appliziert	
2375	1,70/10	1,19	1,52	Der dosierte Methylalkohol entspricht 50 g/70 kg	
2808	1,70/10	1,49	1,60		
3597	Kontrolltier	—	—	10 ml dest. Wasser wurde peroral appliziert	
2357	3,0/20	2,50	2,80	Der dosierte Methylalkohol entspricht 100 g/70 kg	
2100	3,0/20	2,70	2,80		
3590	Kontrolltier	—	—	20 ml dest. Wasser wurde peroral appliziert	

Nach den Angaben der Tabelle 1 kann man feststellen, daß die maximale Blutmethanolkonzentration in der 4. Std entnommenen Blut nach der Oxydationszeit 10 min gemessen wurde.

Aus den Angaben der Tabelle 2 kann man sehen, daß sich der peroral dosierte Methylalkohol in dem entnommenen Blut, nach der 4. Std verhältnismäßig mit der dosierten Menge verändert hat. Es ist bewiesen, daß man die Methode für die Bestimmung des Blutmethanols anwenden kann.

Die Besprechung der Ergebnisse

Die qualitative Reaktion nach EGGRIWE wurde für die Mikrobestimmung des Formaldehyds von BREMANIS ausgearbeitet^{3,4}. Diese Methode benützt man auch für die Bestimmung des Methylalkoholgehalts der Spirituosen nach der Oxydation des Methylalkohols¹⁴. Das Verfahren nach BREMANIS wurde für die Bestimmung des Luftformaldehydgehalts von mir ausgearbeitet¹⁵.

Die neue mikrochemische Bestimmung beweist, daß sie auch für die Bestimmung des Blutmethanols geeignet ist. Mikrodestillation, Mikrodiffusion oder eine andere Manipulation soll man nicht verwenden. 0,02 ml Blut muß „direkt“ einpipettiert werden und die Bestimmung muß nach der Oxydation durchgeführt werden. Die Bestimmung ist kurz, genau, spezifisch für das Formaldehyd und einfach. Eine Färbung ist in 5—10 min nach der Stellung der Testlösung ins Wasserbad entstanden. Dadurch ist die Methode auch für den qualitativen Nachweis der Methanolintoxikation geeignet.

Zusammenfassung

Eine neue mikrochemische Methode wurde vom Verfasser ausgearbeitet, die auf der Bestimmung des Formaldehyds nach BREMANIS beruht. Das Prinzip der Methode ist, daß der Methylalkohol zu Formaldehyd durch die Farbreaktion von Chromotropsäure determiniert wird. Die neue Methode wurde „in vitro“ und „in vivo“ Experimenten ausprobiert. Das neue Verfahren ist genau, spezifisch für das Formaldehyd, einfach, schnell. Es ist sowohl für den toxiko-analytischen Nachweis als auch für die Bestimmung der Methanolintoxikation geeignet.

Diesmal möchte ich für die kollegialen Ratschläge Herrn Direktor Dr. ANTAL JÓZSEF (Országos Birósági Vegyészeti Intézet) und Herrn Adjunkt Dr. SZEGI JÓZSEF (BOTE. Gyógyszertani Intézet) Dank sagen.

Literatur

¹ PROKOP, O.: Lehrbuch der gerichtlichen Medizin. Berlin: VEB Verlag Volk und Gesundheit 1960.

² DAVID, G., u. L. GYARMATI: A gyakorlati toxikológia alapjai. Budapest: Medicina 1963.

- ³ BREMANIS, E.: Z. anal. Chem. **130**, 44 (1949/50).
⁴ EGGRIWE, E.: Mikrochim. Acta **2**, 329 (1937).
⁵ VÉGH, A., u. L. AUBER: Élelmiszervizsgálati Közl. **5**, 4 (1959).
⁶ STEWART, C. P., and A. STOLMAN: Toxicology mechanism and analytical methods, vol. I—II. New York and London: Academic Press 1960.
⁷ WEINIG, R., u. G. NEUGEBAUER: Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med. **41**, 30 (1952).
⁸ AGNER, K., and K. E. BELFRAGE: Acta physiol. scand. **13**, 87 (1947).
⁹ FELDSTEIN, M., and N. C. KLENDSHOJ: Analyt. Chem. **26**, 932 (1954).
¹⁰ WILLIAMS, L. A., R. A. LINN, and B. ZAK: J. forens. Sci. **6**, 119 (1961).
¹¹ SZEGI, J.: Mündliche Mitteilung.
¹² BÁLINT, P., Gy. ADÁM, A. FEKETE u. L. HÁRSING: Az élettan tankönyve. Budapest: Medicina 1963.
¹³ BILDSTEIN, N. V.: Biochem. Z. **146**, 361 (1924).
¹⁴ GARAMI, Gy.: Elelmiszervizsgálati Közl. **4**, 292 (1958).
¹⁵ SUJBERT, L.: Arch. Hyg. (Berl.) **148**, 194 (1964).

Dr. SUJBERT LÁSZLÓ

Budapest, Orvostudományi Egyetem Közegészségtani Intézete, Institutum
Hygienicum Univ. Medicinal, Budapest VIII (Ungarn), Maria Utea 40