

Aus dem Institut für gerichtliche Medizin und Kriminalistik
an der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz
(Direktor: Prof. Dr. med. et phil. KURT WAGNER)

Modifizierte enzymatische Bestimmung von Acetaldehyd im Blutserum (unter Verwendung von ADH und DPN-H-Boehringer)

Von

A. BRAHM-VOGELSANGER und H.-J. WAGNER

(Eingegangen am 15. November 1956)

Bedingt durch die Kenntnisse über die Antabus-Alkohol-Reaktion ergibt sich ein vermehrtes Interesse an einer exakten und weitgehend spezifischen Nachweismethode von Acetaldehyd in biologischem Material.

Die bisher vorwiegend zur Anwendung gelangten Verfahren von E. STOTZ¹ und TH. M. BURBRIDGE und Mitarbeitern² genügen diesen Ansprüchen nicht.

H. HOLZER³ und unabhängig von ihm F. RITZEL⁴ entwickelten auf enzymatischem Wege eine Methode zur Bestimmung von Acetaldehyd, die den Vorzug besitzt sowohl spezifisch als auch zur Erfassung intermediärer Stoffwechselreaktionen empfindlich genug zu sein.

Es wird hier eine modifizierte enzymatische Methode zur Bestimmung von Acetaldehyd mitgeteilt, die im engsten Zusammenhang mit der schon bestehenden und bewährten Mikrobestimmung von Äthylalkohol unter Verwendung von ADH und DPN durchgeführt werden kann. Die Eichkurve des Äthylalkohols dient als Grundlage für die Berechnung des Acetaldehyds, indem die Werte aus dieser Kurve lediglich mit dem Faktor $F = 0,06375$ zu multiplizieren sind, um den Gehalt an Acetaldehyd zu erhalten.

Arbeitsvorschrift

I. Herstellung einer Eichkurve für Acetaldehyd über Äthylalkohol mit ADH und DPN nach folgendem Arbeitsgang.

a) Reagentien — wie von Boehringer zur enzymatischen Blutalkoholbestimmung angegeben — und zwar

I. ADH Boehringer (wird gebrauchsfertig geliefert).

II. DPN-75 wird zum Gebrauch jeweils mit $2,85 \text{ cm}^3$ Aqua bidest. gelöst.

III. 3,4 Vol.-% Perchlorsäure ($2,9 \text{ cm}^3$ 70%ige Perchlorsäure Merck auf 100 cm^3 mit Aqua bidest. auffüllen).

IV. Puffer-Lösung. 10 g Natriumpyrophosphat $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, $10 \text{ H}_2\text{O}$ + 2,5 g Semicarbazid-hydrochlorid + 0,5 g Glykokoll werden in 250 cm^3 Aqua bidest. gelöst, mit 10 cm^3 2n NaOH versetzt und auf 300 cm^3 mit Aqua bidest. aufgefüllt.

b) *Arbeitsgang*. 1 cm^3 bekannte Alkoholtestlösung (jedoch nicht über $1\%_{00}$) + $4,0 \text{ cm}^3$ HClO_4 .

Die Flüssigkeit wird durchmischt (umschütteln) anschließend werden etwa 9 cm³ Pufferlösung in ein geeichtes 10 cm³ Röhrchen gegeben + 0,2 cm³ Alkohol-HClO₄-Lösung + 0,2 cm³ DPN + 0,04 cm³ ADH mit der Pufferlösung auf 10 cm³ auffüllen und nach 70 min photometrieren.

Die Extinktionsmessung erfolgt im ultravioletten Bereich bei 366 m μ , bei einer Schichtdicke von 10 mm.

Bestimmung eines Punktes der Kurve mit 10 Messungen genügt bei Erfahrung mit der fermentativen Blutalkoholbestimmung. (Kontrolle der verwandten Alkoholtestlösung mit der vorhandenen Alkoholkurve.)

Berechnung

Die Alkoholkurve verläuft in diesem Falle (bis zu 1‰) linear, d. h. Meßpunkt und Nullpunkt sind durch eine Gerade miteinander verbunden.

Man hat jetzt nur nach dem Arbeitsgang für Acetaldehyd vorzugehen, die erhaltene Extinktion bzw. den hierzu gehörigen Promillegehalt mit dem Faktor 0,06375 (log = 0,80448—2) zu multiplizieren, um den Acetaldehydgehalt in ‰ zu erhalten.

Am besten zeichnet man sich eine eigene Kurve für die Berechnung des Acetaldehyds, in dem man neben die Achse der Promillewerte des Alkohols die Promillewerte des Acetaldehyds, angefangen von 0,001—0,03‰ aufträgt, einen dazu passenden Extinktionswert aus der Alkoholkurve herausgreift, den dazugehörigen Promillewert des Alkohols mit dem Faktor 0,06375 multipliziert und die gewählte Extinktion mit dem neuen Promillewert des Acetaldehyds als neuen Kurvenpunkt einträgt und zum Nullpunkt eine Gerade zieht.

2. Bestimmung des Acetaldehyds im Blut bzw. Serum.

a) Reagentien*. I. ADH Boehringer (wird gebrauchsfertig geliefert, Artikel Nr. 15418).

II. DPN-H. Boehringer, Artikel Nr. 15142, hiervon werden 25 mg in 2,0 cm³ Aqua bidest. gelöst.

III. Perchlorsäure: 15 cm³ 70%ige HClO₄ Merck in 250 cm³ Aqua bidest. gelöst.

IV. Pufferlösung: 19,28 g Na₄P₂O₇ · 10 H₂O + 1,92 g Glykokoll werden in 250 cm³ Aqua bidest. gelöst.

b) Arbeitsgang. 1 cm³ Serum oder Blut + 4 cm³ HClO₄ werden 5 min bei 3000 U/min zentrifugiert.

Anschließend werden etwa 6 cm³ Pufferlösung wie bei der Alkoholbestimmung in ein geeichtes 10 cm³-Röhrchen gegeben.

Jetzt werden 3 cm³ der HClO₄-Serumlösung hinzugefügt, hierdurch entsteht im Gemisch ein p_H von 6,0—6,2 (Überprüfung mit p_H-Papier Merck). Mit der Pufferlösung wird bis fast zur Marke aufgefüllt und umgeschüttelt, so daß bei Zugabe von 0,1 cm³ DPN-H das Volumen von 10 cm³ gegeben ist.

Es wird sofort die Gesamtlösung oder ein Teil der Lösung — entsprechend der benutzten Cuvette bei der Alkoholbestimmung — photometrisch gemessen bzw. auf Null kompensiert.

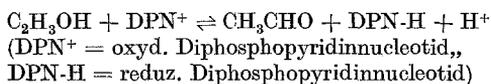
Die Extinktionsmessung erfolgt im ultravioletten Bereich bei 366 m μ , Schichtdicke der Cuvette = 10 mm. Alsdann wird 0,02 cm³ ADH hinzugefügt und die Extinktion bzw. die Extinktionsdifferenz nach 4 min abgelesen.

Bei jeder Meßreihe ist ein Leerwert mitzubestimmen, der von den Messungen abzuziehen ist.

* Der Firma Boehringer Söhne, Mannheim danken wir vielmals für die freundliche Überlassung von Versuchsmengen von ADH und DPN-H bei Ausarbeitung der Methode.

Die Reaktion verläuft am besten bei 20—22° C. Um Acetaldehydverluste zu vermeiden, ist das Material bis unmittelbar zum Ansatz im Kühlschrank aufzubewahren.

3. *Theorie.* Die Reaktion Äthylalkohol — DPN-H und Acetaldehyd — DPN sind als reversibel aufzufassen.



Bei entsprechender Versuchsanordnung läßt sich das Gleichgewicht entweder nach dem Alkohol oder dem Acetaldehyd verschieben.

Die vorhandene Anzahl der Mole Alkohol und Acetaldehyd sind für die entstehende Menge DPN oder DPN-H maßgebend. Demzufolge kann der Extinktionswert von Acetaldehyd durch einen zu ermittelnden Faktor über die Eichkurve des Äthylalkohols auf mg-% bzw. ‰ umgerechnet werden. Es besteht die allgemeine Beziehung:

$$\text{Anzahl der Mole} = \frac{\text{Gewicht des gelösten Stoffes i. L.}}{\text{Molekulargewicht}}$$

Bei dem Ansatz zur Acetaldehydbestimmung wird, um möglichst kleine Aldehydkonzentrationen zu erfassen, die 15fache HClO₄-Serumlösung gegenüber der Alkoholmessung genommen. Hieraus ergibt sich die Gleichung:

$$\begin{aligned} \text{‰ Acetaldehyd} &= \text{‰ Alkohol} \cdot \frac{0,95614^*}{15} \\ &= \text{‰ Acetaldehyd} = \text{‰ Alkohol} \cdot 0,06375. \end{aligned}$$

Hinweise über die Fehlerbreite und die Empfindlichkeit der Methode

Da die Berechnung des Acetaldehyds sich auf eine Eichkurve des Äthylalkohols stützt, ist auch hier der mittlere Fehler, berechnet aus der mittleren quadratischen Abweichung 1,2%, der wahrscheinliche Fehler der Einzelbestimmung 0,8%₂.

Die Eichkurve beginnt bei einem Wert von 0,001‰ Acetaldehyd. Durch Ansatz mit einer größeren Blutserummengung kann eine entsprechend größere Extinktion erzielt und damit noch geringere Acetaldehydmengen erfaßt werden.

Literatur

¹ STOTZ, E.: A colorimetric determination of acetaldehyd in blood. J. of Biol. Chem. 148, 585—591 (1943). Zit. nach K. DIMROTH, Aldehyde und Ketone in HOPPE-SEYLER/THIERFELDERS Handbuch der physiologisch- und pathophysiologisch-chemischen Analyse, herausgeg. von K. LANG u. E. LEHNARTZ, 10. Aufl., Bd. III/1,

* Auf Darlegung der weiteren mathematischen Berechnungen, die zu diesem Faktor führten, wurde der Raumerparnis halber verzichtet.

S. 387. Berlin-Göttingen-Heidelberg 1955. — ² BURBRIDGE, TH. N., CH. H. HINE and A. F. SCHICK: A simple spectrophotometric method for the determination of acetaldehyde in blood. *J. Labor. a. Clin. Med.* **35**, 983—987 (1950). — ³ HOLZER, H., E. HOLZER u. G. SCHULTZ: Zusammenhang zwischen Wachstum und aerober Gärung. *Biochem. Z.* **326**, 385—404 (1955). — ⁴ RITZEL, F. R.: Unveröffentlichte Mitteilung der C. F. Boehringer und Söhne, Biochemische Abteilung, Mannheim. Ferner persönliche Mitteilung, für die wir dem Autor unseren verbindlichsten Dank aussprechen. — ⁵ DOTZAUER, G., H. REDETZKI, K. JOHANNISMEIER u. TH. BÜCHER: Erprobung einer spezifischen Fermentmethode zur Mikrobestimmung von Äthylalkohol. *Dtsch. Z. gerichtl. Med.* **41**, 15 (1952).

Dr. A. BRAHM-VOGELSANGER und Dr. HANS-JOACHIM WAGNER,
Institut für gerichtliche Medizin der Universität Mainz, Stadtkrankenhaus