

Aus dem Institut für Gerichtliche Medizin der Universität Bonn
(Direktor: Prof. Dr. med. H. ELBEL).

Untersuchungen über Empfindlichkeit, Spezifität und Anwendungsmöglichkeiten der Acetonchlorhämireaktion zum Blutnachweis.

Von

Dr. F. L. SCHLEYER.

Mit 4 Textabbildungen.

(Eingegangen am 9. September 1948.)

Der sichere Nachweis von Blut kann durch direkte Besichtigung von Blutkörperchen und spektroskopisch, daneben — mit gewissen Einschränkungen — auch durch die Darstellung von Blutfarbstoffkrystallen geführt werden. Von den Krystallproben werden in der gerichtsarztlichen Praxis seit altersher die *Chlorhämireaktion* (TEICHMANN) mit Kochsalz und Essigsäure und die *Hämochromogenreaktion* mittels reduzierender Substanzen angewandt. Indes ist die TEICHMANNsche Probe bekanntlich nicht ganz einfach und mit ihren zahlreichen Modifikationen heute wohl so gut wie ganz zugunsten der spektroskopischen Verfahren verlassen; eine gewisse Unsicherheit der Hämochromogenreaktion kommt in der Vielzahl der empfohlenen Reagenzien zum Ausdruck. Andere, rasch ablaufende und zuverlässige Blutkrystallreaktionen mit breitem Anwendungsbereich können daher im Praktikum des Blutnachweises nur willkommen sein.

NENCKI und ZALESKI fanden vor etwa 50 Jahren bei analytischen Untersuchungen über die chemischen Wechselbeziehungen und Gewinnungsmöglichkeiten verschiedener Häminkrystalle unter anderem, daß aus Blut durch Behandlung mit Eisessig und Kochsalz erzeugte (Chlor-) Häminkrystalle („Roh-acethäm“) durch Auflösen in chininhaltigem Chloroform oder ammoniakalischem Äthylalkohol und Einbringen dieser Lösung in heißen, mit Kochsalz gesättigten Eisessig (aber auch in Buttersäure oder Milchsäure) umkrystallisiert werden können. Krystallographisch handelte es sich bei diesem Produkt um doppeltbrechende, optisch negative Krystalle des triklinischen Systems von starkem Pleochroismus und einem Auslöschungswinkel von 30—36°. Andere Formen (Spindeln, Drusen aus Nadeln, „Wetzsteine“, sechsseitige Tafeln, Würfel und beinahe kugelige Gebilde entstanden bei Einführung der Chloroformlösung des Chlorhämins in salzsauren Methyl-, Äthyl- oder Amylalkohol (als „Äther des Acethämins“), sowie bei Vermischen von Chlorhäm in aus salzsaurer Amylalkohol mit chininhaltigem Methylalkohol (Abbildungen bei NENCKI und ZALESKI).

Bei Erwärmung von roten Blutkörperchen mit *Aceton* und verdünnter Salzsäure auf dem Wasserbad schied sich das Hämin nach dem Erkalten in langen,

gebogenen, „haarförmigen“ Krystallen (mit schiefem Auslöschungswinkel von 40—43°) und in Blättchen mit schiefer Auslöschung bei 27—31°, sowie in spindelförmigen Krystallen mit gerader Auslöschung ab (Abbildungen im Original). Die Autoren führen das „Acetonhämin“ als eine der krystallisierenden Additionsverbindungen des Häminmoleküls mit indifferenten Substanzen auf. Die Krystalle waren durch Lösung und Einbringen in Eisessig (wie angegeben) leicht in die triklinischen Acethäminkrystalle zu verwandeln, ebenso wie umgekehrt jene (aber nicht die krystallisierten Äther des Acethämins und Häminkrystalle aus Amylalkohol) in Acetonhäminkrystalle überführt werden konnten. Die Spektren des Aceton- sowie des Acethämins und seiner Äther zeigten einheitlich drei Absorptionsbänder bei λ 647—630, 561—538 und 518—500. Für den forensischen Blutnachweis schlugen die Autoren vor, blutbefleckte Gegenstände zunächst in Salzsäure einzuweichen, sie dann im Reagensglas mit Aceton einige Minuten zu erwärmen und den Rückstand nach dem Erkalten mikroskopisch auf Häminkrystalle zu durchmustern.

Bei Versetzen von Blutfarbstoffpulver aus Rohblut mit Aceton und wäßriger Salzsäure erhielt HAMSIK (I) im Niederschlag zunächst vier- und sechsseitige Tafeln, dann kleinere Krystalle in Drusen, zuletzt „kegelförmige“ Gebilde. Die beiden ersten Krystallgruppen ließen sich nach Lösen in Pyridin-Chloroform durch Eintragen in kochsalzhaltigen, heißen Eisessig nach KÜSTER wiederum in TEICHMANNsche Krystalle umscheiden. Weiterhin stellte HAMSIK (III) neben anderen Häminen auch Krystalle des Formyl- und eines Acetylhämins dar, deren Form und Auslöschungswinkel mit denen des Acetonchlorhämins identisch waren. Er gewann die Krystalle des Acetonhämins im übrigen später auf schoneidere Art durch Extraktion des Blutfarbstoffes mit oxalsäurehaltigem Aceton, Zusatz eines Aceton-Salzsäuregemisches zum Auszug und wiederholtes Zufügen wäßriger Salzsäurelösung. Aus 1 Liter Blut erhielt er etwa 4 g in Alkohol ziemlich löslicher Krystalle von einheitlicher Form. Große Länge der Krystalle und ein Auslöschungswinkel von 42° nach der Längskante deutet HAMSIK zufolge auf das Vorliegen eines „Metahämins“ (d. h. eines Hämins einer addierten Substanz) zum Unterschied von einem einfachen Hämin. Das volle Additionsvermögen für Aceton (und andere indifferente Stoffe) besitzt nur die sog. α -Modifikation des Chlorhämins, d. h. ein nicht durch saure oder alkalische Agenzien alteriertes Hämin. Die Verschiedenartigkeit der Acet- und Acetonhäminkrystalle in den Befunden NENCKIS und ZALESKIS führt HAMSIK auf das Auftreten derartiger alterierter (β -) Modifikationen im Verlaufe der Reaktionsvorgänge zurück.

RICHTER bezeichnete das Acetonchlorhämin als ein α -Metahämin und identifizierte es als das Eisenkomplexsalz des α -Protoporphyrins. Krystallographisch fand RICHTER außer den Nadel- und Fadenformen auch rhomboidische Täfelchen. Alle Formen ließen sich in TEICHMANNsche Krystalle umscheiden. Aus dem salzsauren Acetonauszug nach HAMSIK stellte RICHTER auch eine Alterationsform als β -Hämin dar, dessen Krystalle hauptsächlich als in einer Achse verlängerte, monoklinische Würfelchen mit einem Auslöschungswinkel (zur längeren Kante) von 25° und einem Kantenwinkel von 80° auftraten.

RICHTER und HOFMANN wiesen nach, daß die Krystallisation des Acetonhämins nach Zufügung anderer Säuren als der Salzsäure durch die Einwirkung von Chlorionen, die aus dem Blutsubstrat freigesetzt werden, zustande kommt, es handele sich also in jedem Falle um *Chlorhämin*.

Die Darstellung von Häminkrystallen mittels Aceton wurde 1930 von WAGENAAR aufs neue zur Verwendung bei Blutspurenuntersuchungen empfohlen. Die Reaktion sei am besten in der Weise aus-

zuführen, daß die Blutspur auf dem Objektträger mit Aceton und danach mit verdünnter Mineralsäure überschichtet wird, es bilden sich dann sofort in der Kälte charakteristische Nadeln. Die Reaktion versage niemals und sei auch an Fasern u. dgl. bequem anzustellen. WAGENAAR bat um Mitteilung weiterer Erfahrungen mit der Reaktion.

Die Überlegenheit der Acetonhämireaktion über die TEICHMANNSCHE Reaktion wurde in Reihenuntersuchungen von KLINGERT bestätigt. Eine ausgedehnte systematische Prüfung der praktischen Brauchbarkeit der Reaktion stammt von CHIODI (allerdings ohne nähere Angaben über die angewandte Technik).

CHIODI fand die Reaktion positiv mit isolierten Erythrocyten und hämolysiertem Blut, negativ mit Urin, Speichel, Milch, Schweiß, Transsudaten, Eiter und Serum. Er gibt eine Länge der Krystalle von $1-20 \mu$ an. Sie erwiesen sich als unlöslich in destilliertem Wasser, Xylol und Benzol, ganz oder zum Teil löslich in Mineralsäuren, Alkalien, Äthylalkohol, Schwefeläther und Ammoniumsulfid.

Unverdünnte Mineralsäuren und Ameisensäure lieferten reichlicher Krystalle als 20% Mineralsäuren und Essigsäure. Es war an sich gleichgültig, ob Brom- oder Jodwasserstoffsäure, Salpetersäure, Schwefelsäure, Phosphorsäure oder Salzsäure verwendet wurde, die besten Resultate (größte Krystalle) ergab 20—25% Schwefelsäure, Salzsäure, Brom- und Jodwasserstoffsäure. Ersatz des Acetons durch Methyl-, Äthyl- und Diäthylketon bewirkte eine quantitativ deutlich geringere Bildung von Krystallen mit Auftreten großer Mengen bräunlichen Krystallstaubes. Ein ähnliches Bild (ohne Entstehung echter Nadeln) hatte Zugeben von Methylalkohol und Ameisensäure + Mineralsäure zur Folge.

Jenseits einer Verdünnung von Vollblut mit physiologischer Kochsalzlösung oder destilliertem Wasser 1:5 versagte die Reaktion regelmäßig. An Rinder-, Schweine-, Esel-, Hunde-, Affen-, Kaninchen-, Meerschweinchen-, Mäuse-, Hühner- und Taubenblut fielen CHIODI hier und da gewisse Farb- und Größenunterschiede der Krystalle auf, die sich ihm zufolge vielleicht einmal für eine Artdiagnose verwerten lassen könnten.

Mit Ammoniumsulfid und Natronlauge reduziertes Blut gab keine Acetonhäminkrystalle, dies war indes der Fall bei Reduktion mit Eisennitrat und Ammoniak. Mit alkalischem Hämatin (Pyridinzusatz zum Blut) gelang die Reaktion (bei sehr kleinen und farbarmen Krystallen), desgleichen mit Methämoglobin, sie mißlang mit saurem und alkalischem Hämatoporphyrin. Erhitzen von Blut für 15—20 Min. bei 58—97° und für 2 Min. bei 145—150° beeinträchtigte die Krystallbildung nicht, Exposition für 30—40 Sek. bei 600° bedingte negativen Ausfall. Sonnenbestrahlung bis zu 72 Stunden erwies sich als ohne Einfluß, wenn das ausgetrocknete Material danach in Wasser gelöst wurde. Faulendes Blut reagierte vom 50. bis zum 75. Tag mäßig stark, vom 75. bis zum 100. Tag nicht konstant; für mehr als 75 Tage altes Blut empfiehlt CHIODI die Verwendung von unverdünnter Mineralsäure.

An Fasern aus Blutflecken auf verschiedenen Stoffen gelang die Reaktion ausnahmslos, allerdings erst nach Einweichen der Fasern in Kochsalzlösung. Durchweg negativ war die Reaktion an 16—43 Jahre alten Blutflecken auf Stoff. Tränkung von Blutflecken in Seifenlösung hatte keinen störenden Einfluß, Rost auf Eisen erschwerte die Bildung von Krystallen, 95% Alkohol und 10% Formalin machten sie unmöglich.

MELONI prüfte die Reaktion an Blutspuren, die auf gleichen Metallarten verschiedenen äußereren Einwirkungen ausgesetzt, sowie andererseits an Blutspuren auf verschiedenen Metallarten, die den gleichen Einwirkungen unterworfen gewesen waren.

Es ergab sich, daß auf Glas-, Zink-, Kupfer-, Eisen-, Aluminium-, Blei- und Zinnplättchen angetrocknetes Blut nach 4monatiger Lagerung im Exsiccator bzw. nach Aufbewahrung bei Zimmertemperatur bzw. nach 100stündiger Bestrahlung mit ultraviolettem Licht unverändert positiv reagierte. Beim Vergraben in Erde erlosch die Reaktion auf Glas, Zink und Kupfer nach 3 Wochen, auf Eisen, Aluminium, Blei und Zinn schon nach 1 Woche, in der feuchten Kammer blieb sie auf Zink unbeschränkt erhalten, auf Glas, Aluminium und Blei war sie nach 4, auf Kupfer nach 3, auf Zinn nach 2 Wochen, auf Eisen schon nach 1 Woche negativ geworden. Im Freien gelagerte Plättchen mit angetrocknetem Blut zeigten eine positive Reaktion bis zu 9 Wochen auf Glas, bis zu 4 Wochen auf Zink, Kupfer und Blei und nur bis zu 1 Woche auf Eisen, Aluminium und Zinn.

Es waren also vornehmlich die Eisen-, aber auch die Zinn- und die Aluminiumunterlagen, die offenbar infolge chemischer Zersetzung des Blutfarbstoffes die Reaktion am stärksten einschränkten, während Erde das der Reaktion abträglichste Milieu darstellte.

MELONI hält nach dem zeitlich uneinheitlichen Verschwinden der Reagierbarkeit eine verschiedene Wirkung der gleichen Metallunterlage in verschiedenen Medien für erwiesen. Daß die Blutspuren nach der Aufbewahrung in Erde und im Freien schließlich nicht mehr reagierten, führt er in erster Linie auf mechanisches Ablösen der Spuren zurück, während es in der feuchten Kammer vorwiegend die bakterielle und autolytische Zersetzung des Blutes sei, die die Struktur des Blutfarbstoffes verändere.

I. Eigene Erfahrungen mit der Acetonreaktion.

Bei erster Anwendung der Reaktion zum Blutnachweis in der Institutspraxis hatte sich bereits ergeben, daß es unnötig ist, zwischen Spur (Blutschüppchen u. ä.) und Deckglas ein Sandkörnchen oder Haarfragment einzulegen, wie WAGENAAR es vorschrieb. Die gegenseitige Berührungen von Deckglas und Objektträger behindert das Umspülen der Spur mit den Reagenzien nicht. Wohl ist es nützlich, das Substrat, insbesondere harte Blutschollen, möglichst zu zerkleinern, auch staubförmige Teilchen genügen für die Reaktion. Man überflutet dann die Spur unter dem Deckglas mit so viel Aceton, daß etwa $\frac{2}{3}$ des Raumes sich füllen und läßt bis zur völligen Ausfüllung Säure (in den eigenen Versuchen in der Regel 10% Salzsäure) zufließen. Direktes Auftröpfen der beiden Reagenzien ist nicht möglich, da die Flüssigkeiten sich auf diese Weise nicht mischen. Bei Ersatz der Salzsäure durch 10% Schwefelsäure, Salpetersäure oder Orthophosphorsäure fallen die Krystalle in genau der gleichen Weise aus, es ist demnach in der Tat ohne Bedeutung, welche Mineralsäure man zusetzt. Aceton allein ohne Mineralsäurezusatz und Säure ohne Acetonzusatz erzeugen niemals Krystalle.

Die Krystalle bilden sich sofort in der Kälte und werden meistens im Laufe der ersten Minuten noch zahlreicher. Häufig kann man ihre Entstehung aus formlosen gelblich-braunen Konglomeraten unter dem Mikroskop erkennen. Sie liegen bei Blutschollen in der Regel entlang deren Rändern und weniger auf den Schüppchen selbst (im Gegensatz zu den Hämochromogenkrystallen), im allgemeinen auch in einer optisch höheren Ebene als die Schollen; man darf daher beim Durchmustern des Präparates nicht scharf auf das Substrat einstellen.

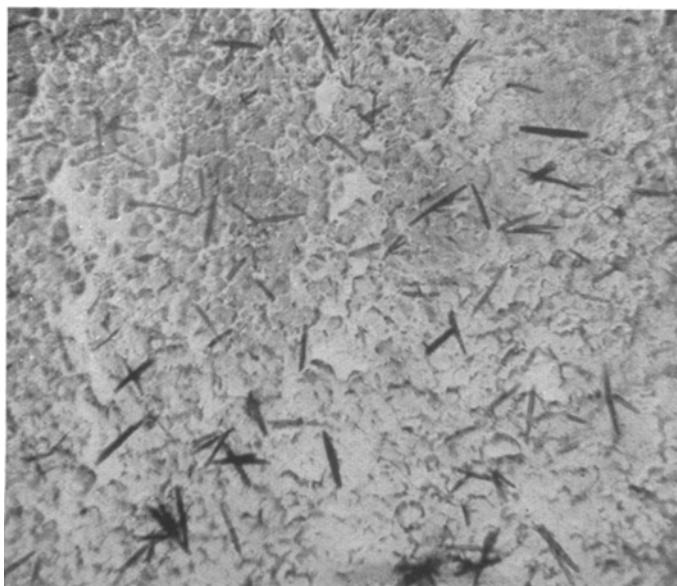


Abb. 1. Reife Acetonchlorhäminnadeln mittlerer Größe. Starke Vergrößerung.

Der Form nach sind es bei der einfachen mikroskopischen Aufsicht lanzettförmige, schwärzliche bis fast durchsichtig-hellbraune, an den Enden öfters gespaltene Nadeln von knapp 3 bis zu 100μ Länge und bis 5μ Dicke, die einzeln oder in sternförmigen Büscheln oder ganzen „Wolken“ zusammenliegen (Abb. 1 und 2). Die Kanten der Nadeln erweisen sich bei sehr starker Vergrößerung als recht uneben. Sehr kleine kommen neben Riesenneedeln im gleichen Präparat vor. Oberflächlich betrachtet haben die Krystalle eine gewisse Ähnlichkeit mit FLORENCE-Krystallen.

Krystallographisch wurde für die Nadeln ein Pleochroismus von n_{α} = tiefbraun bis undurchsichtig und n_{γ} = hellgelb (Dichroismus) bei gerader Auslöschung ermittelt. n_{α} schwingt in der krystallographischen Längsachse, n_{γ} senkrecht dazu. Aus der geraden Auslöschung darf auf ein quadratisches, rhombisches oder trigonal-hexagonales System geschlossen werden. Eine genaue

konoskopische Bestimmung war wegen der Kleinheit der Krystalle nicht möglich. Eine dunkle Längsachse, die Nadeln in starker Vergrößerung zuweilen zu besitzen scheinen, beruht nicht auf einer Substanzverdichtung, sondern entsteht als optisches Phänomen durch Verschiebung der Einstell- zur Bildebene (Totalreflexion an der inneren Krystallfläche)¹.

Die von NENCKI und ZALESKI beschriebenen, langen fadenförmigen Nadeln der Reindarstellung des Acetonhämins treten bei Ausführung der Reaktion auf dem Objektträger niemals auf (die Abbildung von Krystallen aus einem Bluttropfen bei den Autoren zeigt dagegen die

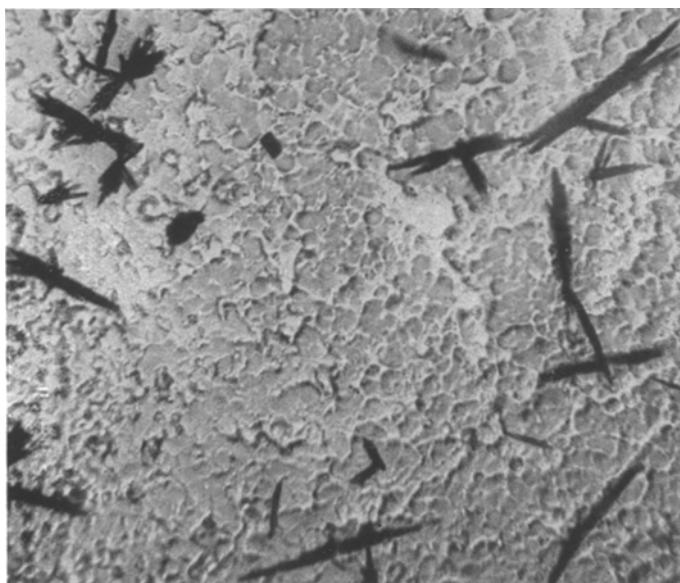


Abb. 2. Reife Acetonchlorhäminnadeln, Riesenformen. Starke Vergrößerung.

typischen Nadeln; schlanke Nadeln, die den Acetonkrystallen stark ähneln, bildet HAMSIK als Krystalle des Monoamyläthers des Acethämins ab). Stets befinden sich mehrere Schichten Krystalle über einander. Je größer die Nadeln sind, desto höher liegen sie. Sie halten sich ohne besondere Fixierung unbeschränkt. Beim Versuch einer Mikroschmelzpunktbestimmung erwiesen die Krystalle sich noch bei einer Erhitzung auf 260° als resistent.

WALCHERS Bemerkung, daß die Acetonhäminkrystalle klein und daher schwer auffindbar seien, ist somit nicht gerechtfertigt. Allerdings ist es ein besonderes Kennzeichen der Reaktion, daß die Krystalle

¹ Die krystallographische Untersuchung führte Herr Dr. J. FRECHEN vom Mineralogisch-Petrographischen Institut der Universität freundlicherweise mit uns aus.

sich (wiederum abweichend von der Hämochromogenreaktion) so gut wie immer nur an einigen Stellen finden, so daß man stets das ganze Präparat absuchen muß. Dieser ganz stereotype Befund läßt sich so ausdrücken: die Reaktion ist zwar bei Vorhandensein von Blut *immer* positiv, jedoch nicht an allen Stellen einer Spur *zugleich*. Offenbar ist die Voraussetzung eines positiven Ausfalles ein optimales Mischungsverhältnis der beiden Reagenzien miteinander und mit dem Blutfarbstoff, das nicht überall im Präparat zustande kommt. Vielleicht reicht auch die vorhandene Acetonmenge oder die Säure nicht zur Bewirkung einer quantitativ vollständigen Umsetzung aus. Es ist daher anzuraten, vorsorglich immer mehrere Präparate einer Spur nebeneinander anzulegen, wenn genügend Material zur Verfügung steht. Scheinbar unerklärlicherweise kann die Reaktion zuweilen an sicheren Blutschollen ganz versagen, und zwar besonders dann, wenn das Blut extrem eingetrocknet ist. In solchen Fällen kann es von Nutzen sein, das Schüppchen in Wasser aufzuweichen und die Reaktion an dem auf diese Weise gelösten Hämoglobin anzustellen.

Im Verlaufe der Versuche mit der Reaktion wurde einmal das Aceton durch *Pyridin* ersetzt. Dabei schossen unter dem Mikroskop rasch und in großer Ausdehnung Krystalle von durchaus ungewöhnlichem Aussehen auf, die zunächst für Hämochromogenkrystalle gehalten wurden, die aber bei genauerer Betrachtung erhebliche Unterschiede aufwiesen.

Bei den Hämochromogenkrystallen, deren Hauptmerkmal ja ihr erstaunlicher Pleomorphismus ist, fallen oft seesternartige Drusen ins Auge, es finden sich außerdem große breite Rechtecke, feine lange Nadeln, in Netzen zusammenhängende zierliche Fäden, aber auch polyedrische Klumpen, Büschel und ganz amorphe Gebilde, sämtlich von sehr verschiedener Größe. Die „atypischen“ Formen sind geradezu charakteristisch. Die Farbe der Krystalle ist in der Regel ein kräftiges Rot, das vom Lachsrot der Fäden und Nadeln bis zu einem Dunkelrot der amorphen Formen spielen kann. Die Krystalle liegen solitär oder eng gehäuft.

Die nach Zusatz von Pyridin und Salzsäure zum Blut entstehenden Krystalle treten regelmäßig in drei, sich deutlich voneinander abhebenden Schichten auf:

Die *oberste Schicht* enthält (überwiegend ziemlich plump) länglich-elliptische bis rechteckige Formen von dunklerot bis brauner Farbe. Hier sind da erinnern die Gebilde an „Stäbchen“ der Bakteriologie, zuweilen ähneln sie „Diplokokken“. Indessen kommen auch ausgesprochen schlanke Nadelformen vor, die isoliert oder in Rosetten- oder Bürstenform angeordnet sind, jedoch selten so schlank und langgereckt sind wie Aceton- oder Hämochromogennadeln. Die stäbchen- oder kokkenförmigen Krystalle liegen meist solitär, aber auch in traubenartigen Haufen oder in Ketten neben- und hintereinander. Als größte Länge solitärer Nadelformen wurden 27 μ , als größte Dicke 9 μ gemessen.

Die *Mittelschicht* zeigt zahllose feine, zum Teil wie amorpher Staub aussehende braune Pünktchen und kurze Fäden.

In der *untersten Schicht* finden sich längliche, im allgemeinen wetzsteinförmige Gebilde von hellbräunlicher bis gelblicher Farbe in dichten netzartigen Konglomeraten. Am Rande dieser „Netze“ entstehen besonders große, entweder langelliptische oder mehr ins Ovale übergehende Formen von zum Teil

geradezu exzessivem Umfang, andererseits sind auch blattförmige bis rundliche Formen der gleichen Größenordnung mit unregelmäßiger, gewellter Randbegrenzung zu beobachten. Sämtliche Gebilde dieser Schicht zeigen auf dem gelblichen Untergrund eine zarte, streifig-feinschollige, sich mitunter zu einer Art „Kernmasse“ verdichtende, hellrötliche Granulierung parallel zum Rand (Abb. 3 und 4).

DILLING hat die Darstellung von Hämochromogenkristallen aus Pyridin und anderen Basen ohne Zusätze angegeben, jedoch konnten die beschriebenen ungewöhnlichen Formen in vielen eigenen Versuchen an Trockenpräparaten auf dem Objekträger niemals mit Pyridin allein, sondern immer nur bei nachträglichem Zusatz von verdünnter Salzsäure erzeugt werden. Außerdem erfolgte die Bildung stets sehr rasch, während die Hämochromogenkristalle aus Pyridin nach DILLING mehrere Stunden zu ihrer Entstehung benötigten.



Abb. 3. Pyridin-Salzsäure-Blutkristalle (unterste Schicht). Nadelformen. Starke Vergrößerung.

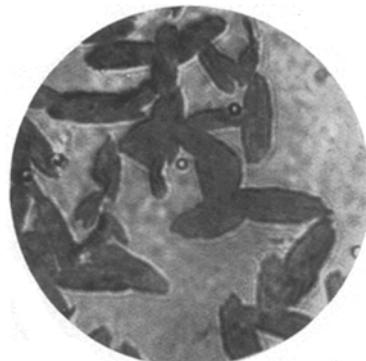


Abb. 4. Pyridin-Salzsäure-Blutkristalle (unterste Schicht). Blattformen. Starke Vergrößerung.

Es liegt daher die Vermutung nahe, daß hier *Pyridin-Chlorhäminkristalle* entstanden waren, denn Chlorhämim kann mit Leichtigkeit organische Basen addieren, die sich in die Halogeneisenengruppe einlagern (KÜSTER). Dies ist um so wahrscheinlicher, als DILLING die beschriebenen Formen in seinem Atlas der Hämochromogenkristalle nicht abbildet oder erwähnt (nur die Reproduktion eines Präparates von Hämochromogenkristallen aus Kohlenoxydhämoglobin nach Piperidinzusatz hat einige Ähnlichkeit mit den obengenannten „Blattformen“; im übrigen treten nach DILLING Hämochromogenkristalle aus Pyridin meist in Form von „Sternen oder Nadelbüscheln“ auf). HAMSIK (II) gewann durch Ausziehen von in Pyridin gelöstem Chlorhämim mit Äther „sehr große“, meist in Drusen gruppierte Krystalle, die sich von den Häminkristallen „durch den mehr roten Farnton und die Form“ unterschieden, er beschreibt sie aber leider nicht näher, später gab er allerdings an (HAMSIK IV), sie seien „den TEICHMANNschen Krystallen ähnlich“.

Die Reaktion mit Pyridin und Salzsäure gelang uns zwar durchaus nicht regelmäßig, und die Krystalle traten nur selten in maximaler Größe auf, sie erschienen aber im positiven Falle stets in den beschriebenen 3 Schichten. Die Mehrschichtigkeit ist offenbar Ausdruck eines Diffusions- oder Konzentrationsgefälles vom Blut zu den Reagenzien. Die größten Krystalle lagen denn auch dem Blut am nächsten. Der dunkle „Kern“ der großen Formen stellt wahr-

scheinlich ein Keimzentrum dar, das möglicherweise aus Chlorhämamin besteht und sich mit Pyridin umgeben hat. — Dies alles ist jedoch nur eine Hypothese; es ist nicht ausgeschlossen, daß es sich bei diesen Krystallen doch nur um besondere Formen von Hämochromogenkrystallen handelt¹.

2. Bestimmung der Empfindlichkeit der Acetonreaktion.

Eine solche Bestimmung hat neben der theoretischen auch eine praktische Bedeutung. Es sind Möglichkeiten denkbar, in denen Blut nicht als Trockenspur, sondern als Beimengung zu anderen Flüssigkeiten oder als ein Bestandteil von Flecken in Stoff oder in ausgewaschenen Flecken nachgewiesen werden muß. Für derartige Fälle kann es wichtig sein, zu wissen, bis zu welcher Verdünnung Blut bzw. Blutfarbstoff noch eine positive Acetonreaktion gibt. Insonderheit ist dies von Belang, wenn dem Untersucher kein Mikrospektroskop zur sicheren Schnelldiagnose von Flüssigkeiten oder Auszügen verdächtiger Flecken zur Verfügung steht, oder wenn die Blutverdünnung bereits so hoch ist, daß die Spektroskopie versagt. Da die Reaktion indes nur am trockenen Präparat ausgeführt werden kann — flüssiges Blut mischt sich nicht mit Aceton — muß ein Tropfen der zu prüfenden Lösung auf den Objektträger verbracht werden: nach dem Verdunsten der Flüssigkeit kann der Rest dann als „Trockenspur“ behandelt werden.

Auf dieser Grundlage wurden Verdünnungsreihen von Blutproben verschiedenen Hämoglobingehaltes angelegt und die Grenze der Reagibilität für jedes der Blute bestimmt. Der Hämoglobingehalt des unverdünnten Citratblutes wurde vor jedem Versuch mit dem HAVE-MANNschen Photozellencolorimeter nach der Cyanidmethode von HAVE-MANN-JUNG-v. ISSEKUTZ bestimmt² oder nach dem SAHLI-Wert durch Dividieren durch 5/4 für Citratblut umgerechnet. Zur Kontrolle wurde eine Verdünnungsreihe von (Met)hämoglobinpulver auf die gleiche Weise untersucht.

Von dem im Verhältnis 1:4 mit Natriumcitrat versetzten Blut wurde eine Stammlösung 1:100 hergestellt. (In der Stammlösung trat trotz Aufbewahrung im Kühlen im Laufe der Versuchsdauer eine unvermeidliche flockige Fäulnistrübung auf, die aber als unerheblich für die Untersuchung angesehen wurde.) Zu 0,5 cm³ dieser Lösung wurde jeweils die dem gewünschten Verdünnungsgrad entsprechende Menge destilliertes Wasser pipettiert (also z. B. für eine 1200fache Verdünnung des Blutes zu 0,5 cm³ der Stammlösung 5,5 cm³ Aqua

¹ Die Bedingungen der Bildung dieser Krystalle werden in einer Dissertation von R. LUEG aus unserem Institut des Näheren untersucht.

² Herr Privatdozent Dr. H. ZIPF (Pharmakologisches Institut der Universität) war so gütig, diese Bestimmungen für uns vorzunehmen.

dest.). Die hohen Blutverdünnungen waren nahezu farblos. Die Stufen der Verdünnung wurden sehr eng gewählt, um durch einen langsamem Anstieg (um nur je $0,1 \text{ cm}^3$ Wasser) eine genaue Kontrolle der Resultate auszuüben und das Schwinden der positiven Reaktion exakt festlegen zu können. Mittels Capillare oder Glasstab wurden 2—3 Tropfen der Blutverdünnung auf den Objektträger aufgetropft und unter staubfreiem Verschluß dem Trocknen überlassen, nach einigen Stunden war dann nur noch ein feiner trockener Randkreis übrig. Eine Beschleunigung des Antrocknens im Brutschrank oder über der Flamme wurde nicht vorgenommen, da hierbei der Tropfen im ganzen scheibenförmig antrocknet, ohne daß sich ein scharfer Randsaum bildet, an dem entlang die Krystalle aufgesucht werden können, außerdem splittert die angetrocknete Spur durch die rasche Erwärmung zu stark auseinander.

Es war zunächst zu konstatieren, daß Zahl, Größe und Farbgehalt der Krystallnadeln *im allgemeinen* mit steigender Verdünnung abnehmen. Das Abhängigkeitsverhältnis zwischen Hämoglobinkonzentration und Krystallgröße ist indes nicht so streng mathematisch, als daß nicht immer wieder plötzlich größere Nadeln auch in höher liegenden Verdünnungsstufen angetroffen wurden. So zeigte z.B. das Präparat der 1500fachen Verdünnung des Blutes „Franz“ nur kleinste Nadeln, während bei der 1860fachen Verdünnung wieder Riesennadeln entstanden. Auch bei ein und derselben Verdünnung fiel die Reaktion bei Wiederholungen manchmal quantitativ etwas verschieden aus, offenbar spielte hier das (sich der Steuerung entziehende) optimale Mischungsverhältnis von Aceton und Säure eine Rolle. Die Krystalle bildeten sich wohl aus diesem Grunde meist auch nur an einer einzigen Stelle des Ringes.

In den höheren Lagen der Verdünnungen waren die Krystalle nur noch als zarte, beinahe punktförmige, bei oberflächlicher Betrachtung mit Luftblaschen und Bruchlinien des Randringes oder feinkörnigen Staubteilchen zu verwechselnde Striche zu erkennen. Das Auffinden dieser minimal kleinen Krystalle war daher mitunter recht mühsam, zumal wenn der angetrocknete hauchfeine Rand kaum in seinem Verlauf unter dem Mikroskop zu verfolgen war. Zuweilen verwischte sich ein sehr blasser Rand nach dem Zufließen der Reagenzien völlig, und das Bild wurde optisch leer. Für eine positive Reaktion wurde daher grundsätzlich das Vorhandensein einer deutlichen Gruppe von mehreren Nadelchen in der für die hohen Verdünnungen charakteristischen hellrötlich-bräunlichen Farbe verlangt. Erleichtert wurde die Wahrnehmung von Krystallen dadurch, daß sie im positiven Falle meist nicht nur auf dem Randringe, sondern auch außerhalb desselben und auffallend oft innerhalb von Luftblasen lagen. Als letzte

positive Verdünnung wurde immer jene angesehen, bis zu welcher eine ununterbrochene Folge positiver Reaktionen zu verzeichnen gewesen war und jenseits welcher entweder nur noch sporadisch positive oder wegen extremer Kleinheit der Krystalle nur als fraglich zu bezeichnende oder negative Reaktionen notiert wurden. Eine Reaktion wurde nur dann als sicher negativ vermerkt, wenn sie bei mindestens viermaliger Wiederholung nicht gelungen war; lag eine negative Reaktion weit unterhalb der später ermittelten kritischen Verdünnungsgrenze, so wurde sie bis zum positiven Ausfall wiederholt.

Die gefundenen Zahlenwerte sind aus Tabelle 1 zu ersehen. Wie aus Spalte 3 hervorgeht, lagen die mit der Acetonreaktion noch nachweisbaren Hämoglobinkonzentrationen der Blutverdünnungen etwa

Tabelle 1. *Minima der Blutfarbstoffmenge bei positiver Acetonreaktion.*

Blut	Hämoglobin in g-% in Citratblut	Reaktion positiv bis Verdünnung*	Hämoglobinkonzen- tration der End- verdünnung in mg-%	Absolute Hämoglobinkonzen- tration in 2—3 Tropfen in γ
Hof	5,4 ¹	1820	3,3	2—3
Rad.	7,35 ²	1480	4,9	3—4,5
Krämer	12,7	1500	8,5	5—7,5
Franz.	13,0	2500 ⁴	5,2	3—4,5
Walter	13,2	1480	8,9	5—8
Reine Hämoglobin- lösung	0,01 ³		9,5 ⁵	6—8,5

¹ Sahli 40%. ² Sahli 55—60%. ³ Ohne Citrat. ⁴ Mit Spitzen bis zu 3100.
⁵ Mit Spitzen bis zu 7,3.

zwischen 3 und 10 mg-%, d. h. um annähernd das 1000fache unterhalb der Farbstoffkonzentration des Ausgangsblutes (Spalte 1). Die zum Vergleich versuchte Spektroskopie gab schon oberhalb von 1000fachen Blutverdünnungen nur noch unsichere Resultate. — Indes ist die Hämoglobinkonzentration einer Flüssigkeit für die Acetonreaktion letzten Endes unerheblich, da nicht der Gesamtgehalt an Blutfarbstoff entscheidet, sondern die an einer Stelle des angetrockneten Tropfens vorhandene Menge, die hier eine Krystallbildung zuläßt. Die an der Verdünnungsreihe der reinen Hämoglobinvergleichslösung ermittelten Werte stimmen mit den Ziffern für Vollblut überein. Die scheinbaren Diskrepanzen in den Werten der letzten noch positiven Verdünnungen im Verhältnis zum Hämoglobingehalt der Ausgangsblute (Spalte 2) sind von wenig Belang, denn der Unterschied im Farbstoffgehalt von zwei aufeinanderfolgenden Stufen, ausgedrückt im Konzentrationswert, betrug nur 1/10 mg, die Endverdünnungen waren somit mehr oder weniger von der gleichen Größenordnung. Die Konkordanz der Ergebnisse geht überzeugend aus Spalte 4 hervor,

in der die absoluten, in der „Spur“ vorhandenen Hämoglobinkonzentrationen errechnet sind (ein Tropfen aus den verwendeten Capillaren wog etwa 30 mg, 2—3 Tropfen wurden jeweils aufgetropft). *Die Anwesenheit von 2—8 γ Blutfarbstoff auf dem Objektträger genügt also zur Bildung von Acetonchlorhäminkristallen.*

Damit dürfte die hohe Empfindlichkeit der Reaktion für den Nachweis von Blut in schwachen Lösungen gekennzeichnet sein. (Es ist demgegenüber auffällig, daß sich in den Versuchen CHTODIS schon bei ganz schwachen Blutverdünnungen keine Krystalle mehr bildeten.) Die mikrospektroskopische Nachweisgrenze des Hämoglobins liegt nach GLAISTER bei 65 γ. OBIGLIO gelang zwar mit der Darstellung von Hämatinkristallen mittels Jodwasserstoffsäure nach der Methodik von STRZYZOWSKY der Blutnachweis aus 5 γ Blut [ebenso bereits TEICHMANN selbst (nach WAGENAAR)], und WAGENAAR wies mit der Acetonreaktion bis zu 50 γ eingetrockneter Blutflüssigkeit nach, indes handelte es sich bei diesen Befunden ja um Ganzblutschüppchen, also um eine kompakte Modifikation des Substrates.

In einer weiteren Versuchsreihe wurde mittels der gleichen Technik die Empfindlichkeit der Acetonchlorhäminkristallreaktion mit der *Hämochromogenreaktion* verglichen. Die angetrockneten Restringe wurden zum Zwecke der Darstellung von Hämochromogenkristallen mit der Lösung nach TAKAYAMA II versetzt. Der Versuch wurde nur an einer Verdünnungsreihe (bei Anstieg der Stufen um 0,5 cm³ Wasser) ausgeführt. Eine Krystallbildung in Form feinster Nadeln ließ sich hierbei nur bis zu einer 1100fachen Blutverdünnung beobachten, sporadische Spitzenreaktionen mit einer Krystallbildung an dem einzigen noch erkennbaren Reststück des Randsaumes traten bei 1400- und 1500-facher Verdünnung auf. Der negative Ausfall der Reaktion in darüberliegenden Blutverdünnungen hat jedoch seine Ursache nicht in einer grundsätzlich geringeren Empfindlichkeit der Hämochromogenreaktion, sondern ist akzidenteller Natur: das Pyridin des Reagenzes löst allzu kleine Blutfarbstoffreste in wenigen Sekunden gänzlich auf —, über die potentielle Fähigkeit des Reagenzes, auch in sehr hohen Blutverdünnungen noch Hämochromogenkristalle zu bilden, ist damit nichts gesagt. *Somit dürfte die Acetonreaktion mit ihrer Verwendung indifferenter Reagenzien der Hämochromogenreaktion beim Blutnachweis in Flüssigkeiten von sehr geringem Farbstoffgehalt überlegen sein.*

Auf Grund der vorstehend geschilderten Erfahrungen ist für den mikroskopischen Nachweis von Blut in sehr hohen Verdünnungen mittels der Acetonchlorhäminkristallreaktion bei Anwendung der beschriebenen Trockentropfenmethodik zu empfehlen, den zu untersuchenden Tropfen recht dick zu machen, um möglichst viel Farbstoff in ihm aufzuhäufen, den Tropfen sodann völlig eintrocknen zu lassen, die

Reaktion aber innerhalb von 24 Stunden anzustellen, da der zarte Trockenrand bei längerem Warten zu sehr abblaßt und sich außerdem leicht mit feinen Staubteilchen bedeckt.

Daß sich aus Nadelgröße und -zahl nicht unbedingt Rückschlüsse auf die in einer Lösung vorhandene Hämoglobinmenge ziehen lassen, wurde bereits erwähnt. Beide sind mehr oder weniger vom Zufall der Mischung abhängig. Wenn sich auch bei der praktischen Ausführung der Reaktion ein bestimmtes optimales Verhältnis zwischen Blutmenge, Aceton und Säure niemals willkürlich wird herstellen lassen, wurde zum Abschluß des quantitativen Teiles der Studie der Versuch gemacht, wenigstens *in vitro* zu ermitteln, in welchem Verhältnis die drei Komponenten anwesend sein müssen, damit die größten Nadeln entstehen. Citratblut, Aceton und Mineralsäure (in diesem Fall Phosphorsäure) wurden in Kombinationen von 1, 3 und 6 cm³ miteinander gemischt. Bereits bei Zusatz des Acetons zum Blut fiel augenblicklich ein grobflockiger, weißlicher Niederschlag aus, der sich nach Zufügen der Säure meist verdickte und grau oder schwarz verfärbte (Bildung sauren Hämamins). Es entwickelte sich dabei eine geringe Reaktionswärme und etwas Gas (nach HAMSIK III durch Verdrängen von Sauerstoff aus dem Hämoglobinmolekül durch das Aceton). Der nach Zentrifugieren der Gemische vorhandene Rückstand war in Menge und Dicke recht verschieden; in 3 Fällen blieb die ganze Mischung zähflüssig, 8mal war der Rückstand nur gering, 7mal war seine Menge mäßig groß, in den übrigen 8 Fällen war das Gemisch im ganzen fest geronnen.

Bei mikroskopischer Besichtigung der Ausstriche der Bodensätze und Rückstände ergab sich, daß unter den 26 möglichen Mengenvariationen überhaupt nur in 7 Fällen sich Krystalle gebildet hatten, und zwar in den Kombinationen 1 cm³ Blut — 3 cm³ Aceton — 1 cm³ Säure (Versuch d der Reihe), 1 — 3 — 3 (Versuch e), 1 — 6 — 3 (Versuch h), 3 — 3 — 1 (Versuch q), 3 — 6 — 1 (Versuch r), 3 — 6 — 6 (Versuch v) und 3 — 6 — 3 (Versuch y). Es traten hierbei reichlich Wachstumsformen auf. Im einzelnen zeigte d mäßig viel typische Nadeln von riesiger Größe bis zu 120 μ Länge und 15 μ Dicke mit zum Teil gespaltenen Enden, daneben auch federkielartige Skeletformen mit dunkelfarbiger, über ein Ende hinausragender, blattstielaartiger Längsachse, im übrigen aber nur groben, amorphen Krystallstaub (Krystallite). e bot massenhaft plumpe, dunkelbraune sechsseitige Tafeln (Schnitte prismatischer Krystalle mit aufgesetzten Bipyramiden), außerdem auch Rechtecke mit monopyramidalem Ende. Gleichartige, ganz grobe, hell- bis dunkelbraune Vorstufenformen mit einer größten Länge von 30 μ bei einer größten Breite von 9 μ fanden sich auch in h. Im Sinne der bisherigen Untersuchung „typische“,

d. h. ausgewachsene, meist recht schlanke Nadeln von 1 bis zu $27\ \mu$ Länge enthielt q. r zeigte nur Krystallite. v wies massenhaft kurze, sowie schlankovale Nadeln, ferner Skeletformen und Leisten mit Pyramidenenden (und ziemlich ungerader Randbegrenzung), daneben auch reichlich kleinste, nahezu amorphe Bröckel auf. Die größten Mengen typischer Nadeln (von mittlerer Größe) enthielt γ.

Ein orientierender Vorversuch hatte bereits folgendes Resultat gezeigt: Verhältnis der drei Bestandteile Blut—Aceton—Säure 1:10:3 (entspricht etwa Versuch r) = winzige Nadeln und amorphe Partikel; Verhältnis 2:2:1 (entspricht etwa Versuch q) = reichlich sehr kleine Nadeln; Verhältnis 1:5:3 = Nadeln in allen Größen, überwiegend aber kleine; Verhältnis 4:2:1 = einige typische Nadeln mittlerer Größe; Verhältnis 2:8:3 = Nadeln bis mittlerer Größe; Verhältnis 1:3:2 (entspricht etwa Versuch d) = gewaltige Mengen Nadeln, darunter auch recht große.

Feste Regeln sind aus diesen Befunden nicht abzuleiten: sowohl ein Überschuß von Blut im Verhältnis zum Aceton, wie umgekehrt des Acetons zum Blut erzeugt Krystalle, zum Teil in unreifen Formen. *Immerhin scheint ein etwa 2—5faches Überwiegen der Acetonmenge über das Blut der Krystallbildung am förderlichsten zu sein.* Die Säuremenge betrug in allen vorstehenden Fällen niemals mehr als die Blutmenge, meist lag sie unter ihr. Die größten Nadeln in Endform erzeugten die Kombinationen 1 — 3 — 1 und 1 — 3 — 2.

Eine Beziehung zwischen Menge und Dicke des Rückstandes einerseits und der Krystallbildung bzw. ihrem Reifegrad andererseits bestand offenbar nicht: z. B. gehörten h und v zu den im ganzen geronnenen Kombinationen, boten aber keineswegs die größten oder reifsten Nadeln und in den anderen 6 Totalniederschlägen sowie in 3 Kombinationen mit einer mäßigen Rückstandsmenge waren überhaupt keine Krystalle enthalten. Allerdings scheint die Krystallbildung doch wohl an eine gewisse Niederschlagsmenge gebunden zu sein, denn in den 11 Gemischen ohne oder mit nur geringem Rückstand war durchweg keine Krystallbildung zustande gekommen.

3. Versuche hinsichtlich der Spezifität der Acetonreaktion.

Die Reaktion wurde in der oben angegebenen Technik auch an anderen gefärbten Körperflüssigkeiten und Ausscheidungen ausgeführt, und zwar zunächst an *Urin* vom Gesunden, *Faeces* und *Ikterusharn*. Bei diesen Substraten war keine Spur einer Krystallbildung festzustellen. Dagegen entstanden in einem Präparat von *Galle* zahllose, völlig charakteristische, unmeßbar kleine bis $9\ \mu$ lange Nadeln. Allerdings ließ sich dieser Befund kein zweites Mal reproduzieren, vielmehr traten in anderen Präparaten von *Galle* entweder überhaupt keine

Krystalle oder den Acetonnadeln recht unähnliche Gebilde auf: nämlich völlig farblose, schlanke, gerade, durchweg stumpfendige Nadeln von einer Länge bis zu 60μ , die zum Teil Wachstumssporne zeigten; daneben gleichartige, mehr länglich-rechteckige und kurze rhombische Formen. Aber auch diese Krystalle bildeten sich nicht einmal regelmäßig in Präparaten der gleichen Galle. Ob die Form der entstehenden Krystalle etwa von der Farbe der flüssigen Galle im Einzelfall (mehr braun oder mehr grün) abhängt, wurde nicht näher untersucht. Auf Grund dieser Befunde könnte man indes annehmen, daß auch das eisenfreie Porphin mit gesprengter Ringbindung noch eine Fähigkeit zur Bildung von Chlor,,hämin“ (?) besitzt, während die atypischen blassen Nadeln vielleicht als „Acetonchlorbilirubin“ bezeichnet werden könnten.

Des weiteren wurde die Reaktion an verschiedenen Tierbluten angestellt (gewisse Blutarten weisen ja besondere Modifikationen ihrer Hämoglobinkrystalle bei Reindarstellung auf). Es wurde Blut von *Huhn, Hund, Kaninchen, Katze, Maus, Meerschweinchen, Pferd, Rind, Schaf, Schwein und Ziege* gewählt; morphologische Unterschiede waren nicht wahrzunehmen: die Nadeln waren stets völlig identisch mit einander und mit den Acetonkrystallen aus Menschenblut. CHIODIS Befunde von Unterschieden in Größe und Farbe betrafen wohl zufällige Varianten, wie sie bei der Reaktion in gewissen Grenzen durchaus gewöhnlich sind. Nur ein Hundeblutpräparat zeigte außer den typischen Krystallen an einer Stelle auch sehr lange, ganz blasse, zum Teil rechteckige Krystalle, deren Anordnung an sog. „gestrickte“ Skeletformen erinnerte, zum Teil auch hauchdünn-strichförmige Krystalle, die Ähnlichkeit mit den fädigen Formen NENCKIS hatten. Daß die TEICHMANNSchen Krystalle für alle Hämine gleich sind, gilt als unbestrittene Tatsache.

4. Die Acetonreaktion an Hämoglobinabbauprodukten.

Es blieb nunmehr noch näher zu prüfen, ob und zu welchem Punkte die Acetonreaktion auch mit *Derivaten des Blutfarbstoffes* positiv ausfällt. Methoden zum Nachweis von Blut an dessen Abbauprodukten sind ja in der Spurenkunde wichtig, da alternde Blutspuren sich bekanntlich im Laufe der Zeit zersetzen. Diese Zersetzung wird begünstigt durch Exposition im Freien, Feuchtigkeit und Hitze. Blut kann sich somit infolge chemischer Veränderungen des Häminmoleküls einem späteren Nachweis ganz entziehen. Auch künstlich erhitzte Blutreste enthalten nur Spaltungsprodukte des ursprünglichen Hämoglobins. Es wurden also mittels unserer üblichen Technik Versuche mit der Reaktion an spontan entstandenen und künstlich erzeugten Abbaustufen des Blutfarbstoffes vorgenommen, besonders im

Hinblick auf die Befunde CHIODIS. Die Varianten der sauerstofftragenden Komponente des Hämoglobins (Methämoglobin, Kohlenoxyd-, Stickoxyd-, Sulf- und Cyanhämoglobin), sowie der Eiweißanteil des Blutfarbstoffes konnten bei der experimentellen Prüfung der Reaktion an verändertem Blut als für den Reaktionschemismus belanglos außer Betracht bleiben.

An der blutig verfärbten *Fäulnisflüssigkeit* aus der Brusthöhle einer 5 Monate alten, aus dem Erdgrab exhumierten Leiche war die Reaktion kräftig positiv. Mit gefaultem, 16 Monate altem, im Reagensglas asserviertem *Vollblut* bildeten sich neben amorphem Krystallstaub auch viele, allerdings recht kleine, typische Nadeln (die Kleinheit der Krystalle aus faulem Blut erwähnt auch CHIODI). Eine zum Vergleich angestellte Hämochromogenreaktion (mit Pyridin und Schwefelammonium) war im ersten Falle negativ, im zweiten Falle entstanden an einer Stelle des Präparates zahlreiche schwärzliche (!) kurze Nadeln und plumpe, ganz kurze, strichförmige Stäbchen; bei Zusatz des Reagenzes nach TAKAYAMA II bildeten sich keine Krystalle. Damit war die Brauchbarkeit der Acetonprobe gegenüber stark gefaultem Blut festgestellt, gleichgültig, ob hier auch schon Hämochromogen oder gar Deuteroporphyrin vorgelegen hatte. Mehr allgemein hatte WAGENAAR bereits angegeben: „Auch altes und halbverwestes Blut gab mir immer ein positives Resultat.“ Auch an Teerfaeces aus dem Mastdarm einer frischen Leiche fiel die Reaktion übrigens stark positiv aus.

Durch Reduktion frischen Blutes mit Ammoniumsulfid und Versetzen mit 30% Natronlauge wurde sodann *Hämochromogen* in vitro hergestellt und am angetrockneten Tropfen der Reaktion unterworfen. Es bildeten sich sofort die charakteristischen Acetonkrystalle, allerdings war ihre Farbe etwas blasser als gewöhnlich. Weiterhin wurde durch Zufügen von konzentrierter Schwefelsäure zu Blut und Erwärmen *saures Hämatoporphyrin* und durch anschließendes Neutralisieren mit 2% Natronlauge und Auflösen des entstandenen Niederschlages im Überschuß von 30% NaOH *alkalisches Hämatoporphyrin* dargestellt. Da das Antrocknen der Tropfen des sauren Hämatoporphyrins infolge des hohen Siedepunktes der Schwefelsäure große Schwierigkeiten machte, wurden nur kleinste Spuren des Substrates auf den Objektträger verbracht. Der nach einigen Tagen entstandene hellbräunliche Trockenrand wurde nach Absaugen des flüssigen Mittelteiles des Tropfens und Überschichten mit den Reagenzien unsichtbar, das mikroskopische Bild war optisch leer. Auf tropfen der Reagenzien auf den flüssigen Tropfen hatte das gleiche negative Ergebnis. In einer dritten Modifikation wurde eine ganz geringe Spur der Flüssigkeit auf dem Objektträger ausgestrichen und unter dem Deckglas wie üblich

mit den Reagenzien überschichtet: hierbei erschienen nur in einem Präparat nebst polyedrischen durchsichtigen Kräställchen verschiedener Größe zahlreiche farblose, meist in Drusen und Haufen liegende überwiegend sehr lange und stumpfendige Nadeln ohne alle Ähnlichkeit mit Acetonkrystallen. In den Präparaten des alkalischen Hämatorphyrins kam es auf dem Untergrund der verschiedenen Salzkristalle und bräunlicher amorpher Massen ebenfalls nicht zu einer Bildung von Acetonkrystallen.

Es kann demnach vermutet werden, daß die Reaktion auch im Verlaufe des natürlichen Blutabbaues bei Zerstörung des Häminmoleküls negativ wird. Diese These wird durch die eingangs zitierten Befunde MELONIS an verwitterten und durch Metalle chemisch angegriffenen Blutspuren erhärtet. Wie die einmal beobachtete Bildung typischer Acetonkrystalle aus Bilirubin mit diesem Ergebnis in Einklang zu bringen ist, bleibe dahingestellt, sollten im übrig en aber jene blassen stumpfen Nadeln des „Acetonbilirubins“ nicht mit den morphologisch gleichen Krystallen aus saurem Hämatoporphyrin chemisch identisch sein?

Um schließlich einen ungefähren Anhalt zu gewinnen, inwieweit sich *aus intensiv erhitztem Blut* Acetonchlorhämim darstellen lässt, wurde flüssiges Blut 1 und 2 Stunden im Wasserbad gekocht. Die nach dem Erkalten an den schmierig-braunen Koagulaten ausgeführte Reaktion war kräftig positiv. Ebenfalls positiv war die Reaktion an Methämoglobinpulver, das in Röhrchen für 1 und 2 Stunden in Wasser bei 100° belassen worden war; die Krystalle waren hier von tiefschwarzer Farbe. Dagegen war die Reaktion sowohl an Koagulaten von flüssigem Blut wie an Methämoglobinpulver nach 1- und 2stündigem Erhitzen bei etwa 200° im Sandbad durchweg, und zwar auch bei zahlreichen Wiederholungen, negativ. Beide Substrate waren hier nach der Erhitzung zu harten, splitterigen Bröckeln geworden, mikroskopisch waren die Methämoglobinpartikel in rundliche und halbmondförmige, zum Teil auch polyedrische Schollen verwandelt. Zur Orientierung wurde gleichzeitig die Benzidinreaktion angestellt, die immer (mit Ausnahme des 2 Stunden bei 200° erhitzten Methämoglobinpulvers) kräftig positiv ausfiel.

Die kritische Grenze der Acetonkrystallbildung aus erhitztem Blut liegt also zwischen 100 und 200° C, wie sich bereits nach den Angaben CHIOTDIS hatte vermuten lassen, wobei eine kürzere Erhitzung auf 200° das Hämoglobinmolekül offenbar stärker angreift als längeres Erhitzen auf 100° (die Koagulationstemperatur des Hämoglobins liegt bei 64°)¹. Immerhin dürfte es ratsam sein, harte Blutschollen nach

¹ Über die genaue Festlegung der kritischen Erhitzungsgrenze, auch im Vergleich mit der Hämochromogenreaktion, berichtet K. LIEDERWALD in einer Dissertation aus unserem Institut.

dem Vorschlag von CHIODI zunächst 1—2 Tage in einigen Wassertropfen zu weichen, da danach eine anfänglich negative Reaktion noch gelingen kann (s. LIEDERWALD). Nach WAGENAAR lassen sich Hämochromogenkristalle noch nach stundenlangem Erhitzen von Blut auf 125° erhalten, ebenso nach Erhitzen auf 200° bis zu 25 Min. SCATAMACCHIA konnte aus Blutproben, die 2—10 Min. Temperaturen von 140—220° ausgesetzt gewesen waren, nach den Verfahren von TAMASSIA OTTOLENGHI und STRZYZOWSKY keine TEICHMANNschen Kristalle mehr erzeugen.

Zusammenfassung der Ergebnisse und Schlußfolgerungen.

Die Acetonchlorhämireaktion ist eine sehr einfache und zuverlässige Methode des qualitativen Blutnachweises an Trockenspuren mit einer recht großen Anwendungsbreite. Sie gestattet den Nachweis von minimal 2—8 γ Blutfarbstoff in einer Spur. Die Kristalle lassen sich auch aus stark gefaultem Blut, aus Methämoglobin, dagegen nicht mehr aus Hämatoporphyrin und aus Blut, das bei 200° gekocht wurde, gewinnen. Die Reaktion ist indes insofern nicht streng „organspezifisch“, als sie anscheinend auch mit Galle, d. h. mit Bilirubin (dagegen nicht mit Harn- und Kotfarbstoffen) positiv ausfallen kann.

Die Reaktion läßt sich bequem auch an bluthaltigen Flüssigkeiten und Auszügen anstellen und ist hierbei an Empfindlichkeit der Hämochromogenreaktion überlegen; es müssen hierfür Trockenpräparate von Tropfen auf dem Objektträger angefertigt werden. Es wurden Hinweise zur Ausführung der Reaktion gegeben. Der Kristallbildung am förderlichsten ist ein etwa 2—5faches Überwiegen des Acetons über das Blut.

Die Acetonchlorhäminkristalle zeigen gerade Auslöschung und Dichroismus. Die Entstehung aus Kristalliten und Skeletformen konnte beobachtet werden. Die Kristalle aus Menschenblut und Blut einer Anzahl von Haustieren sind morphologisch völlig identisch, die Reaktion ist somit zur Artdiagnose nicht verwertbar.

Die Reaktion tritt am Hämoglobin- bzw. Häminmolekül ein, ohne daß eine Überführung des Hämoglobins in eine Abbauf orm (wie beim Nachweis des Blutes als Hämochromogen) notwendig ist. Sie leistet daher an Auszügen von Blutflecken im besonderen dann mehr als die Hämochromogenreaktion, wenn das Hämoglobin etwa durch Chemikalien unfähig zur Hämochromogenbildung (PUPPE) geworden ist.

Die oft so „halsstarrige“ TEICHMANNsche Probe, die essentiell nicht von der Acetonchlorhämireaktion verschieden ist, sollte zu deren Gunsten ganz aus dem hämatologischen Praktikum verschwinden.

Literatur.

CHIODI, V.: Zacchia (It.) **1940**, 125. — Arch. Antrop. crim. **1940**. — DILLING, W.: Atlas der Krystallformen und der Absorptionsbänder der Hämochromogene. Stuttgart 1910. — HAMSIK, A.: Z. physiol. Chem. **80**, 35 (1912); **169**, 64 (1927); **190**, 199 (1930); **241**, 156 (1936). — HAVEMANN, R., F. JUNG u. B. v. ISSEKUTZ: Biochem. Z. **301**, 116 (1939). — KLINGERT, J.: Diss. Würzburg 1939. — MELONI, F.: Diss. Zürich 1940. — Arch. Kriminol. **114**, 105 (1944). — NENCKI, M., u. J. ZALESKI: Z. physiol. Chem. **30**, 384 (1900). — OBIGLIO, J.: Arch. med. leg. (Arg.) **6**, 233 (1936). — PUPPE, G.: Z. gerichtl. Med. **1**, 663 (1922). — RICHTER, A.: Z. physiol. Chem. **190**, 21 (1930). — RICHTER, A., u. M. HOFMANN: Z. physiol. Chem. **113**, 334 (1938). — SCATAMACCHIA, E.: Zacchia (It.) **1933**, 137. — WAGENAAR, M.: Z. anal. Chem. **79**, 101 (1930); **103**, 417 (1935). — Arch. Kriminol. **100**, 276 (1937). — WALCHER, K.: Gerichtlich-medizinische usw. Blutuntersuchung. Berlin 1939.
