

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

Über Versuche zur Blutartunterscheidung aus dem Verlauf der Alkalidenaturierung

Von

F. SCHLEYER

Mit 4 Textabbildungen

(Eingegangen am 3. Januar 1961)

Auf Zusatz von Lauge wird die Häm-Globinbindung denaturiert, die rote Farbe und die Hb-Banden schwinden, es entsteht das sog. alkalische Häimatinglobin. Daß die *Geschwindigkeit* dieses Vorgangs,

Tabelle 1. Reihenfolge der Denaturierungsgeschwindigkeiten nach KRÜGER (20 vol. Blut + 1 vol. 10% NaOH), bestimmt als Zeit in Minuten bis zum Verschwinden der Hb-Banden

Blutart	absolut	Mensch=1
Mensch	0,73	1
Katze	1,11	1,5
Hund	3,3	4,1
Taube	11,5	17
Kaninchen	21	30
Huhn	62	85
Pferd	80	110
Meerschweinchen .	137	188
Schaf	> 1290	1800
Rind	> 1440	2000
Schwein	> 1440	2000

Tabelle 2. Denaturierungszeit in Minuten bis zur Extinktionskonstanz nach BLUMENFELD und KRASOVICKAJA (2 ml Vollblutverdünnung mit $\pm 0,3\%$ Hb + 0,3 ml 0,1 n NaOH)

Blutart	Minuten
Mensch	1,5—2,5
Katze	6—7
Hund	12—14
Huhn	> 60
Ziege	> 60
Rind	> 60
Schaf	> 60

also die Resistenz des Blutfarbstoffs, je nach der *Species* verschieden ist, wurde schon vor fast 100 Jahren von KÖRBER entdeckt, dessen Befunde von KRÜGER, MAGNANIMI, ZIEMKE und neuerdings photometrisch von BLUMENFELD und KRASOVICKAJA bestätigt wurden (Tabelle 1 und 2). Menschenblut (mit Ausnahme des fetalen Blutes) hat die relativ höchste Denaturierungsgeschwindigkeit (zur Kinetik s. HAUBOWITZ u. Mitarb., die anscheinend als erste die fortlaufende photometrische Registrierung, allerdings mit anderer Fragestellung, anwandten). Nachdem wir in einer orientierenden Nachprüfung der Methodik von BLUMENFELD artverschiedene „Typen“ von Denaturierungskurven gefunden hatten (SCHLEYER 1961), wurden die Reaktionsverläufe nunmehr systematisch verglichen.

1. Versuche an Frischblut

Methodik

Frisches Vollblut mit Na-Citrat- oder -fluoridzusatz wurde mit NaCl-Lösung in steigendem Verhältnis verdünnt. Nach Filtrieren wurden jeweils 2 ml in 10 mm-Cuvetten mit 0,3 ml 0,1 n NaOH versetzt und sofort gut durchmischt; dieses von BLUMENFELD angegebene Mengenverhältnis erwies sich in eigenen Vorversuchen an Menschenblut als optimal; alle höheren Laugenzusätze oder -konzentrationen denaturierten zu schnell, schwächere Konzentrationen wirkten zu langsam oder überhaupt nicht mehr (s. unten).

Alle 15–30 sec wurde dann (im Photometer „Eppendorf“) die Extinktion bei 578 nm gemessen, d. h. an der Stelle der größten Amplitudendifferenz zwischen den Maxima des O₂Hb- und des Alkalihämatinspektrums im sichtbaren Bereich (das Spektrum des alkalischen Hämatins hat zwischen 510 und 590 nm kein ausgeprägtes Maximum). Das Denaturierungsprodukt wird in schwachen Blutlösungen mehr oder weniger farblos, d. h. nicht *brown*, gestattet daher keine Messung im Bereich der Maxima des Alkalihämatins.

Um vom verschiedenen Hb-Gehalt der Ausgangssubstrate unabhängige Meßwerte zu erhalten und gleichzeitig die relativen Unterschiede der von der Verdünnung abhängigen Extinktionshöhe zu eliminieren, wurden alle Extinktionen in Prozent des Ausgangswertes aufgetragen. Sämtliche Denaturierungskurven wurden mehrmals aufgenommen, alle Wiederholungsversuche ergaben stets deckungsgleiche Kurven, von denen jeweils eine abgebildet wurde.

Ergebnisse

a) *Menschenblut*. Die Denaturierungskurve zeigt einen charakteristischen Verlauf, der am deutlichsten bei den Blutverdünnungen von etwa 1:250 bis 1:1000 ausgeprägt ist (Abb. 1). Dieser Kurven „typ“ findet sich schon bei BISCHOFF und SCHULTE in anderem Zusammenhang (colorimetrische Beobachtung der Farbdenaturierung von Säuglingsblut) abgebildet. Die sofort beginnende und rasch annähernd maximal verlaufende Denaturierung ist wahrscheinlich durch das Überwiegen einer schnell zersetzlichen Hb-Komponente (etwa 90 %, RAMSEY) im Menschenblut zu erklären; es verbleibt dann nur ein wesentlich resistenterer Hb-Rest: daher die primäre „Knickung“ der Menschenblutkurven im mittleren Verdünnungsbereich. Nach RAMSEY zeigt nur Ratten- und Alligatorblut ein analoges Verhältnis der Hb-Komponenten; allerdings scheinen Beziehungen zum p_H und zum Oxydationszustand der Substrate zu bestehen (ROSSI-FANELLI u. Mitarb.).

Bei stärkeren und schwächeren Verdünnungen flachen sich die Kurven in gleicher Weise ab: im ersten Fall ist die vorhandene O₂Hb-Menge *absolut* zu gering geworden, im zweiten Fall ist sie *relativ* zu groß; mit einem etwas höher konzentrierten NaOH-Zusatz (0,25 n) ließ sich denn auch eine der „typischen“ angenäherte Form der Denaturierungskurve einer Blutverdünnung 1:100 erzielen (Abb. 1; punktierte Kurve); noch stärkere NaOH-Lösungen denaturierten dann sofort vollständig.

Die Denaturierungszeit bis zur annähernden Extinktionskonstanz hängt vom Verhältnis der O_2Hb -Konzentration zum Laugenzusatz ab; bei dem Standardzusatz von 0,1 n NaOH ist sie bei sehr großen und sehr geringen Blutverdünnungen relativ am längsten. Die Amplitude der Denaturierung ist ungefähr gleich, sie beträgt im Verdünnungsbereich 1:250 bis 1:950 rund 50–60% der Ausgangsextinktion. Dieser Wert ist nach 3 min erreicht. Mit Laugenkonzentrationen von 0,25 bis 1 n

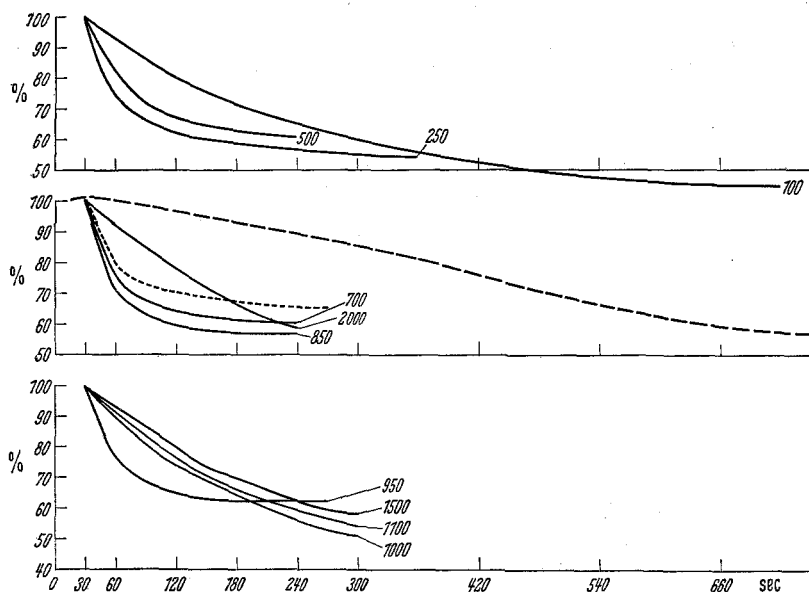


Abb. 1. Menschenblut, Verdünnung 1:100 bis 1:2000, Denaturierung mit 0,1 n NaOH, photometrische Meßwerte in Prozent der Ausgangsextinktion. Gestrichelte Kurve: Verdünnung 1:500, Denaturierung mit 0,05 n NaOH. Punktierte Kurve: Verdünnung 1:100, Denaturierung mit 0,25 n NaOH

ließ sich die Denaturierung einheitlich bis 40% des Ausgangswertes weitertreiben, die offenbar das mit dieser Methodik erreichbare Maximum darstellen.

Bei relativ sehr schwachen Laugenkonzentrationen trat in der allerersten Meßphase eine vorübergehende geringe Extinktionszunahme auf, die durch eine anfängliche Verschiebung zum Absorptionsmaximum infolge der Alkalisierung zu erklären ist (Abb. 1, gestrichelte Kurve und Tabelle 3); dieser Effekt wird dann durch die zunehmende Denaturierung aufgehoben (s. unten).

b) Affenblut (*Macacus cynomolgus*, Java-Affe). Die Denaturierungskurven ähneln denen des Menschenblutes, die Entfärbung setzt sich jedoch bei höheren Blutkonzentrationen nur zögernd durch (Abb. 2).

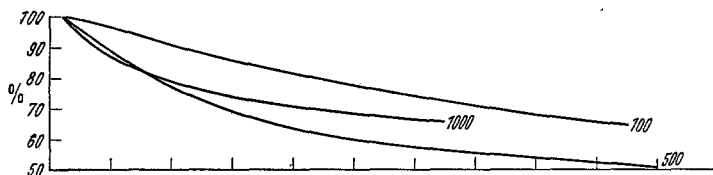
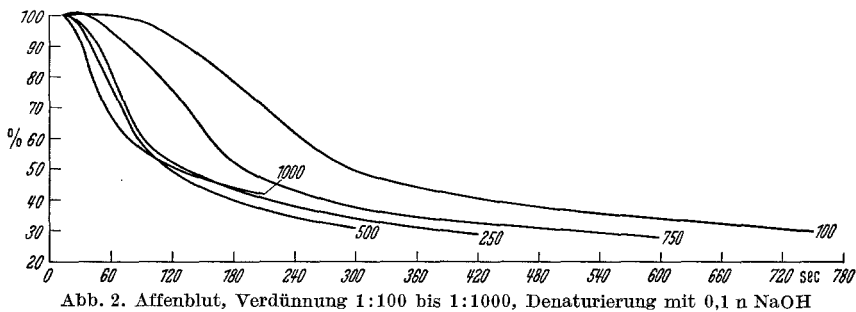


Abb. 3. Hundeblut (oben), Verdünnung 1:100 bis 1:1000. Hühnerblut (unten), Verdünnung 1:250 und 1:500, Denaturierung mit 0,1 n NaOH

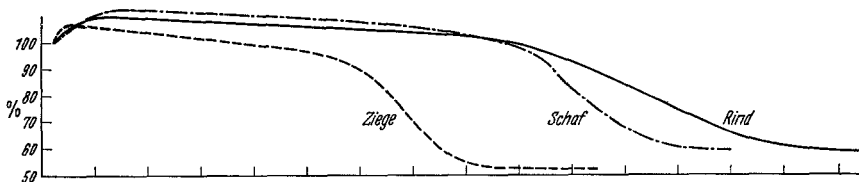


Abb. 4. Schafblut (---), Ziegenblut (---), Rinderblut (—), Verdünnung 1:500. Schweineblut (unten), Verdünnung 1:100 bis 1:1000, Denaturierung mit 0,1 n NaOH

c) *Hundeblut*. Die Denaturierung verläuft, wie nach den in Tabelle 1 und 2 zusammengestellten Angaben zu erwarten, bereits merklich lang-

samer, Extinktionskonstanz beginnt sich ab etwa 6 min einzustellen. Im Gesamtverlauf zeigen die Kurven als einzige von allen untersuchten Denaturierungsverläufen eine den Menschen- und Affenblutkurven ähnliche Form (Beispiele in Abb. 3).

d) *Hühner- und Taubenblut*. Alle Substrate zeigen ausgeprägt den bereits unter a erwähnten, vorübergehenden Extinktionsanstieg als Folge der Alkalisierung. Die Denaturierung setzt dann träge ein, und annähernde Konstanz beginnt erst nach 10 min (Beispiele in Abb. 3).

e) *Kaninchenblut*. Die Hauptdenaturierung vollzieht sich vielleicht etwas rascher als bei den Vogelblutarten, die Kurvenbilder unterscheiden sich aber sonst nicht.

f) *Pferdeblut*. Die Kurvenformen unterscheiden sich kaum von den Typen d—e.

g) *Schafblut*. Die eigentliche Denaturierung beginnt erst spät, erreicht dann aber rasch ihr Maximum (Beispiel in Abb. 4).

h) *Ziegenblut*. Die Kurven sind praktisch identisch mit dem Typ g. Die etwas schnellere Denaturierung des Beispiels kann durch einen geringeren Hb-Gehalt der Ausgangsblutprobe erklärt werden (Abb. 4).

i) *Rinderblut*. Wie Typ g—h (Abb. 4).

k) *Schweineblut*. Sämtliche Kurven zeigen infolge ihrer Kürze scheinbar ein besonders ausgeprägtes primäres „Alkalisierungsphänomen“ (d. h. starke Krümmung nach oben im Anfangsteil). Die Denaturierung scheint einheitlich sehr schnell abzulaufen, wie sonst nur beim Menschen- und Affenblut (Beispiele in Abb. 4).

Tabelle 3. *Extinktionen* $\times 100$
je 30—60 sec bei Zusatz von je
3 Tropfen 0,05% NH_4OH , 0,01 n
HCl und 0,9% NaCl-Lösung
zu Schweineblut 1:500

sec	NH_4OH	HCl	NaCl
	503	537	555
60	520	535	562
90	530		565
120	540		565
150	547		570
180	554	535	569
240	560	532	569
300	570	532	570
360	571	531	567
420	579	530	569
480	580	530	569
540	580	530	569
600	580	530	569

2. Versuche an gealtertem Blut

a) Blutflecken

Methodik. Mit frischem Blut wurden Flecken auf Leinen hergestellt. Stücke von einigen Quadratzentimetern wurden dann nach mehrwöchiger Lagerung bei Raumtemperatur kleingeschnitten und in Wasser ausgezogen. Die Extrakte wurden so verdünnt, daß sie grobsichtig einer Vergleichsverdünnung von Vollblut 1:500 entsprachen. Die weitere Bestimmungsmethodik war wie oben.

Ergebnisse. Infolge der O_2Hb -Reduktion und -Umwandlung durch die Alterung war auch die Alkalidenaturierbarkeit nach 1—2 Monaten so gut wie aufgehoben, obwohl z. B. die Pferde- und Rinderblutflecken-auszüge spektrophotometrisch bei 540 und 580 nm noch Maxima

zeigten. Alle Typenunterschiede waren ebenfalls geschwunden, allerdings scheint Menschenblut eine gewisse Denaturierbarkeit noch am stärksten zu bewahren (bis zu 1 Monat).

b) Trockenblut

Methodik. 12—14 Jahre alte Blutschüppchen wurden möglichst konzentriert in Wasser gelöst.

Ergebnisse. Im Prinzip wie unter a. Einige Tierblutauszüge boten nach dem Alkalizusatz überhaupt keine Extinktionsänderung; diese Extrakte besaßen auch nur eine gelbliche (statt rote) Färbung und zeigten weder spektrophotometrisch Maxima, noch bei der Acetonchlorhämין-Reaktion (SCHLEYER 1949) Kristalle.

Besprechung

Eine gewisse Artunterscheidung ist nach den Ergebnissen nur bei flüssigem Vollblut und vielleicht bei ganz frischen Blutspuren möglich; Voraussetzung ist eine so große Blutmenge, daß sich eine Verdünnung entsprechend einer etwa 500fachen Blutverdünnung herstellen läßt. Typenmäßig heben sich Menschen- und Affen-, sowie Hunde- und Schweineblut von allen anderen untersuchten Blutarten ab, sofern 0,1 n Lauge zur Denaturierung benützt wird: nur diese Laugenkonzentration liefert vergleichbare Ergebnisse, bei stärkeren oder schwächeren Laugenzusätzen verwischen sich die Typen. Ein Vergleich der nach einer bestimmten Zeit jeweils erreichbaren Denaturierung in Prozent gestattet keine weitere Differenzierung, da dieser Betrag durchweg zwischen 40 und 70% liegt und vom zufälligen Ausgangs-Hb-Gehalt abhängt.

Das Phänomen der Alkalidenaturierung wurde hier nur am *Vollblut* und seinen Alterungsprodukten untersucht (zur Frage der Denaturierbarkeit von Hb-Lösungen vgl. KOMMER). Alles in allem eignet sich die Methodik nur unter den oben angegebenen Bedingungen zur Blutartunterscheidung, stellt aber selbst mit dieser Einschränkung nur eine Art Vorprobe dar.

Zusammenfassung

Vollblut vom Menschen und von verschiedenen Säugetierarten wurde in wechselnden Verdünnungen mit unterschiedlich konzentrierten Zusätzen von Natronlauge versetzt. Der Verlauf der Alkalidenaturierung wurde als Extinktionskurve photometrisch aufgenommen. Gewisse Unterschiede in Denaturierungsverlauf und -geschwindigkeit wurden ermittelt, sie gelten aber nur für flüssiges Blut und frische Blutflecken-auszüge, sowie in einem bestimmten Blutverdünnungsbereich und bei optimaler Laugenkonzentration.

Summary

Human and mammal whole blood in various dilutions was treated by different sodium hydroxyde concentrations. The development of alkali denaturation was photometrically recorded. Certain differences of denaturation type and speed do exist, but may be helpful in species diagnosis only for blood in its fluid state or for extracts of recently shed blood. Further, only a certain range of blood dilutions and an optimum alkali concentration will permit a differentiation.

Literatur

- BISCHOFF, H., u. SCHULTE: Weitere Untersuchungen und Studien zur Hämoglobinresistenz im Säuglingsalter. *Jb. Kinderheilk.* **62**, 56 (1926).
- BLUMENFELD, L., u. S. KRASOVICKAJA: Unterscheidung von Menschen- und Tierblut mittels verschiedener Denaturierungsgeschwindigkeit des Hb durch Basen. In: *Fragen der gerichtsmedizinischen Beurteilung*, Teil 2. Moskau: Staatsverlag für juristische Literatur 1955.
- HAUROWITZ, F., R. HARDIN und M. DICKS: Denaturation of hemoglobins by alkali. *J. physic. Chem.* **58**, 103 (1954).
- KÖRBER, E.: Über Differenzen des Blutfarbstoffs. Diss. Dorpat 1866.
- KOMMER, H.: Photometrische Untersuchungen über die Alkalidenaturierbarkeit von Menschen- und Tierhämoglobinlösungen. Diss. Bonn 1961.
- KRÜGER, F.: Über die ungleiche Resistenz des Blutfarbstoffs verschiedener Tiere gegen zersetzende Agentien. *Z. Biol.*, N. F. **6**, 318 (1888).
- Vergleichende Untersuchungen über die Resistenz des Hämoglobins verschiedener Tiere. *Z. vergl. Physiol.* **2**, 254 (1925).
- MAGNANIMI, R.: *Riv. med. leg.* **2**, 33 (1898/99). Zit. nach ZIEMKE.
- RAMSEY, H.: A comparative study of hemoglobin denaturation. *J. cell. comp. Physiol.* **18**, 369 (1941).
- ROSSI-FANELLI, A., G. AZZONE und B. MONDOVI: Alkalidenaturation of myoglobin and hemoglobin. *Arch. Biochem.* **58**, 119 (1955).
- SCHLEYER, F.: Untersuchungen über Empfindlichkeit, Spezifität und Anwendungsmöglichkeiten der Aceton-Chlorhäm-inreaktion zum Blutnachweis. *Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med.* **39**, 495 (1949).
- Investigation of biological stains with regard to species origin, in: *Methods of Forensic Medicine*, vol. I, New York: Interscience Publ. 1961.
- ZIEMKE, E.: Über die ungleiche Resistenz des Blutfarbstoffes verschiedener Tiere gegen Alkalien. *Vjschr. gerichtl. Med.* **22**, 77 (1901).

Prof. Dr. F. SCHLEYER, Bonn, Wilhelmsplatz 7