

Die Anwendung der Chemiluminescenz des Luminols in der gerichtlichen Medizin und Toxikologie

I. Der Nachweis von Blutspuren

K. WEBER

Institut für gerichtliche Medizin und Kriminalistik der Medizinischen Fakultät
und Institut für medizinische Forschung und Arbeitsmedizin
der Jugoslawischen Akademie der Wissenschaften in Zagreb

Ein eingegangen am 16. Mai 1965

Luminol (3-Aminophthalhydrazid) weist bei der Oxydation (Dehydrierung) in alaklischer Lösung eine intensive hellblaue Chemiluminescenz auf, wobei Häminproteide als ausgesprochene Katalysatoren (Promotoren) dieser Erscheinung wirksam sind. Diese Chemiluminescenz ist schon seit 1928 bekannt (ALBRECHT, GLEU und PFANNSTIEL) und wurde im Laufe der Jahre vielseitig erforscht (Literaturverzeichnisse bei WEBER, 1942, ETIENNE, 1953, WHITE, 1961). In die gerichtliche Medizin wurde sie durch SPECHT (1937) eingeführt, und zwar als Vorprobe zum Nachweis von forensisch wichtigen Blutspuren. In der Toxikologie der Organophosphorgifte verwendet man diese Leuchtreaktion seit dem Vorschlag von GOLDENSON (1957) mit Erfolg zur Detektion und zur quantitativen Bestimmung von Nervengiften (Sarin, Tabun u. ä.), aber auch zur Bestimmung von Insekticiden auf der Basis von Organophosphorverbindungen (WEBER, HUTIĆ und MRAZOVIĆ, WEBER und MATKOVIĆ).

Da wir seit vielen Jahren die Luminolreaktion in beiden der erwähnten Richtungen praktisch anwenden, aber auch an ihrer wissenschaftlichen Erforschung beteiligt sind, sollen hier unsere praktischen Erfahrungen mitgeteilt werden. Besonders wird dabei auf die optimalen Reaktionsbedingungen hingewiesen, die eine sehr hohe Empfindlichkeit der Reaktion ergeben. Weiterhin werden die Vorteile der Verwendung von modernen Meßapparaturen für die Luminescenz auch in der forensischen Praxis besprochen.

Die Versuchsmethode

Zu den quantitativen Messungen der Intensität der Chemiluminescenz des Luminols wurden photoelektrische Meßvorrichtungen verwendet (WEBER, 1941), deren Strahlenempfänger (Photoelement, Photozelle oder Sekundärelektronenvervielfacher) sich unmittelbar unter dem Becherglas (100 ml) befand, in welchem sich die Luminolreaktion abspielte. Das Licht der Chemiluminescenz wirkte so direkt auf den

Strahlenempfänger, und dessen Photostrom konnte mit einem empfindlichen Spiegelgalvanometer (Empfindlichkeit bis $1,10^{-9}$ Amp/mm) gemessen werden. Bei Anwendung dieser Ausschlagmethode bestand gewöhnlich Proportionalität zwischen der Intensität der Chemiluminescenz und dem dazugehörigen Galvanometerausschlag. Werden die Galvanometerausschläge während des Ablaufes der Luminolreaktion in bestimmten Zeitabständen gemessen, so können die Intensität-Zeitkurven der Chemiluminescenz gezeichnet werden. Diese zeigen einen steilen Anstieg der Luminescenzintensität, die gewöhnlich schon in einigen Sekunden

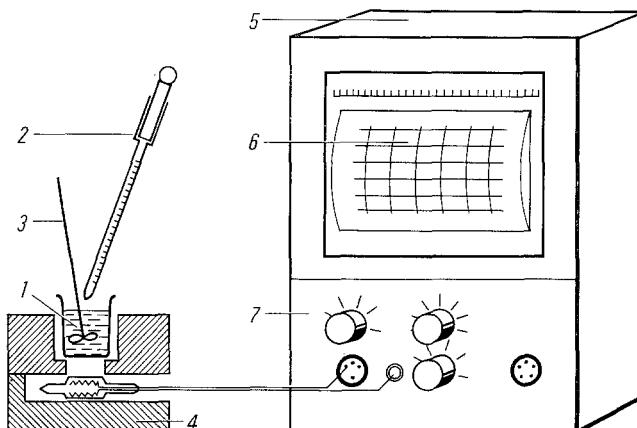


Abb. 1. Schema der photoelektrischen Meßapparatur mit automatischer Registrierung

ihren Maximalwert erreicht und dann mehr oder weniger rasch, aber oft auch nur allmählich absinkt. Schließlich erlischt die Luminescenz, oft in der Reaktionszeit von einigen Minuten. Der quantitative Verlauf der Intensität-Zeitkurve ist von den Versuchsbedingungen abhängig, wobei besonders die Konzentrationen der Reaktionsteilnehmer eine wesentliche Rolle spielen.

Die Intensität-Zeitkurven bzw. die zeitliche Änderung der dazugehörigen Photoströme können auch durch einen *automatischen Schreiber* aufgezeichnet werden. Das ist nicht nur bequemer, sondern auch genauer, weil alle Phasen der Kurve kontinuierlich erfaßt werden. Die meisten Messungen dieser Arbeit wurden mit dem Standard-Kompensations-Schreiber GIBI der Firma C. Zeiss-Jena in Kombination mit einer gasgefüllten Photozelle MGS für sichtbares Licht durchgeführt. Das Schema der Versuchsanordnung zeigt die Abb. 1. Mit 1 ist in diesem Schema das Gefäß mit der Reaktionslösung bezeichnet, mit 2 die Kolbenpipette zum Eintragen der Katalysatorlösung (Blutlösung u. ä.), mit 3 ein Rührer, mit 4 die Photozelle und mit 5 der Schreiber. 6 ist die laufende Papierrolle am Schreiber, und auf der Platte 7 sind die elektrischen

Schaltkontakte zur Änderung der Meßempfindlichkeit, der Nullpunkt-einstellung usw. angebracht. Der Schreiber kann mit fünf verschiedenen Empfindlichkeiten betrieben werden, wobei die einzelnen Empfindlichkeitsstufen im Verhältnis 1:2:4:10:20 stehen. Die Meßempfindlichkeit kann auch noch optisch durch Verwendung von Graufiltern oder einer Irisblende zwischen dem Reaktionsgefäß und der Photozelle vermindert werden. Die Vorschubgeschwindigkeit des Registrierpapiers kann in den Grenzen von $\frac{2}{3}$ mm bis 900 mm/min verändert werden. Bei der Registrierung der Chemiluminescenz des Luminols hat sich eine Vorschubgeschwindigkeit von 30 mm/min bewährt.

Die *maximale Luminescenzintensität* (\mathcal{D}_m) — Maximum der Intensität-Zeitkurve — kann offenbar als Maß der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit und damit auch als Maß der Wirksamkeit bzw. der Konzentration des Katalysators betrachtet werden. Andererseits entspricht das Integral der Intensität-Zeitkurve — Fläche unterhalb der Kurve — der *Lichtsumme* (L) der Luminescenzreaktion, die als relatives Maß der gesamten ausgestrahlten Lichtenergie zu werten ist. Wir haben die Lichtsummen der einzelnen Versuche durch planimetrische Ausmessung der entsprechenden Flächen am Registrierpapier mit dem Kompensations-Polarplanimeter 3005 von REISS vorgenommen.

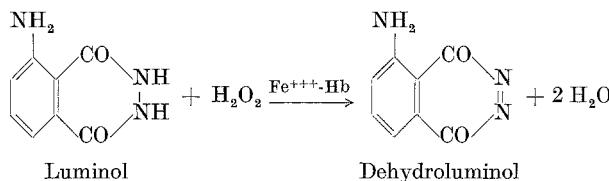
Allgemeines über die Luminolreaktion

Die wässrigen Lösungen für die Luminolreaktion haben drei Komponenten: 1. das Luminol, 2. einen basischen Stoff und 3. ein Oxydationsmittel. Da das Luminol in Wasser nur sehr schwer löslich ist, wird es gewöhnlich direkt in der basischen Komponente der Reaktionslösung gelöst. Als basische Komponenten werden verwendet: Natronlauge oder Soda bzw. tertiäres Natriumphosphat, während als Oxydationsmittel Wasserstoffperoxyd, Kaliumferricyanid, Natriumperborat und Natriumperoxyd gebraucht werden können. Die letzten zwei Stoffe ersetzen in gewissem Grade die basische Komponente des Reaktionsgemisches. Natriumperborat wird besonders bei den Versuchen mit Organophosphorgiften verwendet. Häminproteide geben intensive Chemiluminescenz bei Anwesenheit von Wasserstoffperoxyd im Reaktionsgemisch. Kaliumferricyanid gibt mit alkalischen Lösungen des Luminols ein schönes Reaktionsleuchten auch ohne Anwesenheit eines Katalysators.

Wird die Lösung für die Luminolreaktion mit Wasserstoffperoxyd oder Natriumperborat sorgfältig bei Verwendung sehr reiner Chemikalien und besonders *sehr reinem Wasser* hergestellt, so zeigt sie ohne Zusatz eines entsprechenden Katalysators keine wahrnehmbare Chemiluminescenz. Verunreinigungen, besonders von Schwermetallverbindungen, ergeben jedoch ein geringfügiges Selbstleuchten der Luminol-Reagenslösung. Damit hängt auch die Haltbarkeit der Lösung zusammen.

Nichtleuchtende Reagenslösungen, oder nur sehr schwach leuchtende, sind tagelang haltbar und verwendbar. Ist das Selbstleuchten ausgesprochener, so kann die Reagenslösung nur frisch bereitet verwendet werden und ist nach 1—2 Std unbrauchbar.

Die katalytische Wirkung der Häminproteide auf die Luminolreaktion wird als eine *Peroxydasewirkung* aufgefaßt (WEGLER; SCHWAB und ROST) und kann, wenn man das Häminproteid mit $\text{Fe}^{+++}\text{-Hb}$ bezeichnet, durch folgende Bruttogleichung veranschaulicht werden:



Für einen solchen prinzipiellen Reaktionsverlauf spricht auch die Tatsache, daß auch Meerrettich-Peroxydase als Katalysator der Luminolreaktion wirksam ist. Die freie Energie solcher Oxydationsreaktionen wird ausschließlich als Licht der Luminescenz ausgestrahlt. Strenggenommen handelt es sich aber nicht um eine reine Katalyse, weil das Häminprotein bzw. ein anderer Wirkstoff während des Verlaufes der Luminolreaktion irreversibel inaktiviert wird. Es wäre vielleicht bezeichnender, von einer Promotorwirkung des Hämoglobins und der anderen Wirkstoffe auf die Luminolreaktion zu sprechen.

Außer der Peroxydasewirkung ist im Verlauf der Luminolreaktion, besonders bei der Katalyse durch Organophosphorgifte, auch noch eine *Katalasewirkung* anzunehmen (MATKOVIĆ und WEBER). Dabei setzt der Katalysator aus dem H_2O_2 elementaren Sauerstoff frei und dieser wirkt dann dehydrierend auf das Luminol, wobei die Reaktionsenergie wieder als Lumineszenzlicht in Erscheinung tritt. Ein solcher Mechanismus erscheint auch deshalb möglich, weil elementarer Sauerstoff unter besonderen Umständen eine verhältnismäßig intensive Chemilumineszenz des Luminols verursachen kann (P. C. WILHELMSEN, R. LUMRY und H. EYRING).

Der Nachweis von Blutspuren

Als Hilfsmittel zum Nachweis von forensisch wichtigen Blutspuren wurde von SPECHT ein Luminolreagens angegeben, das 0,1 Teil Luminol, 5 Teile Natriumcarbonat und 15 Teile Wasserstoffperoxyd (30% ig) auf 100 Teile dest. Wasser enthält. Dieses Reagens fand Eingang in die gerichtsmedizinische Literatur und Praxis (SCHWERD). Die Empfindlichkeit der Leuchtreaktion mit diesem Reagens wird bei angetrockneten Bluttropfen bis zu Verdünnungen von 1:2000 angegeben.

Wir haben aber durch systematische Prüfung der Konzentrationsverhältnisse aller Komponenten der Reagenslösung durch quantitative Messungen festgestellt, daß unvergleichlich bessere Luminollösungen verwendet werden können. Zunächst ist statt Natriumcarbonat die Verwendung von Natronlauge zu empfehlen. Bei der stark alkalischen Reaktion der Natronlauge im Reagens ergibt sich kein wesentlicher Unterschied in der Wirkung von getrockneten und frischen Blutspuren bzw. Blutlösungen. Es handelt sich offenbar darum, daß auf die Luminolreaktion nur Methämoglobin (Hämoglobin) katalytisch wirkt, das im angetrockneten Blut vorwiegend vorhanden ist. Im Reagens mit Natronlauge wird nun bei der stark alkalischen Reaktion das Hämoglobin des Frischblutes rasch durch die Wirkung des Wasserstoffperoxyds in Methämoglobin verwandelt, und dieses löst dann die Chemiluminescenz aus. Bei der schwächer alkalischen Reaktion des Reagens mit Carbonat findet die Oxydation des Hämoglobins nur langsam statt und die Luminescenz ist deshalb wesentlich schwächer. Außerdem erhöht aber die stark alkalische Reaktion der Natronlauge ganz wesentlich die Empfindlichkeit der Leuchtreaktion.

Weiterhin sind die Konzentrationen des Luminols und besonders des Wasserstoffperoxyds im Reagens von SPECHT viel zu hoch. Diese zu hohen Konzentrationen bedingen eine *Konzentrationsinhibition* der Luminolreaktion, eine damit verbundene ausgesprochene Lösung der Chemiluminescenz und wesentliche Herabsetzung der Empfindlichkeit des Nachweises von Blutspuren.

Wir verwenden seit vielen Jahren mit bestem Erfolg ein Luminolreagens, das wie folgt erhalten wird. Man stellt drei *Stammlösungen* her:

I. NaOH 0,4 N; 8 g festes Natriumhydroxyd gelöst in 500 ml dest. Wasser.

II. H_2O_2 0,176 M; 10 ml Wasserstoffperoxyd 30%ig + 490 ml dest. Wasser.

III. Luminol 0,004 M; 0,354 g Luminol gelöst in 62,5 ml NaOH 0,4 N und mit dest. Wasser auf 500 ml aufgefüllt.

Diese Stammlösungen sind monatelang unverändert haltbar, und zum Gebrauch werden zu 70 ml dest. Wasser je 10 ml der drei Stammlösungen hinzugefügt und gut vermischt. So wird ein Luminolreagens erhalten, das kein sichtbares Selbstleuchten zeigt und tagelang verwendet werden kann. Die Empfindlichkeit des Nachweises von Blutspuren mit diesem Reagens liegt mindestens bei einer Grenzkonzentration des Blutes von 1:10000000, wobei es gleichgültig ist, ob es sich um Lösungen von angetrockneten Blutspuren (Methämoglobin) oder um Lösungen von Frischblut (Oxyhämoglobin) handelt. Es ist zweckmäßig, die Stammlösung III mit dem Luminol einige Tage vor der ersten Verwendung herzustellen. Reagenslösungen, die mit frischer Stammlösung III be-

reitet werden, ergeben geringere Intensitäten der Chemiluminescenz. Es handelt sich offenbar darum, daß die vollständige Bildung des Anions der Lactimform des Luminols, das für den Reaktionsbeginn maßgebend ist, in der schwach alkalischen Lösung etwas Zeit braucht. Die Stammlösung II soll hingegen nicht zu alt sein, da bekanntlich Wasserstoffperoxyd in verdünnten Lösungen nicht sehr stabil ist.

Die Abb. 2 zeigt Intensität-Zeitkurven der Chemiluminescenz, die mit dem angeführten Reagens und mit Hilfe des beschriebenen Kompen-sationsschreibers erhalten wurden. Es wurde jeweils zu 19 ml Reagens

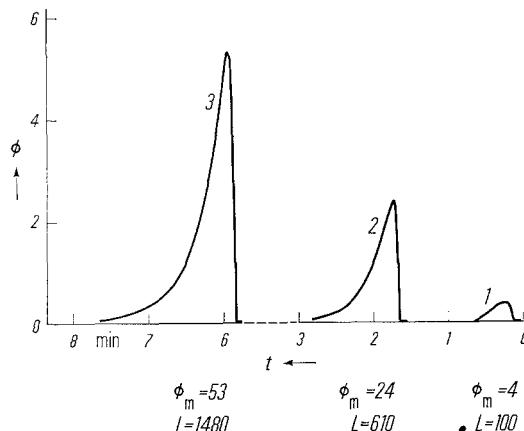


Abb. 2. Intensität-Zeitkurven (ϕ -t) der Chemiluminescenz des Luminols bei Zusatz von Blutlösungen. Blutverdünnungen 1:10 000 000 (Kurve 1), 1:2 000 000 (Kurve 2) und 1:1 000 000 (Kurve 3)

1 ml Blutlösung (Frischblut) hinzugefügt. Die angeführten Blutverdünnungen geben immer die Verdünnung in der Blutlösung an, die dem Reagens hinzugefügt wurde. Die Kurve 1 der Abb. 2 wurde mit einer Blutverdünnung 1:10 000 000 in dest. Wasser und der höchsten Empfindlichkeit der Meßapparatur erhalten. Es ist wesentlich, daß diese Luminescenz auch visuell sehr schön wahrzunehmen ist. Die Kurven 2 und 3 derselben Abbildung wurden unter gleichen Bedingungen mit Blutverdünnungen 1:2 000 000 bzw. 1:1 000 000 erhalten. Die relativen maximalen Luminescenzintensitäten (ϕ_m) und die Lichtsummen (L), bezogen auf die *höchste Empfindlichkeit* der Meßapparatur, sind für die einzelnen Kurven der Abb. 2 und der folgenden Abbildungen mit angeführt.

Um das von uns verwendete Luminolreagens mit NaOH im Vergleich zum Reagens mit Na_2CO_3 nach SPECHT bewerten zu können, zeigt die Abb. 3 Lumineszenzkurven, die unter gleichen Versuchsbedingungen mit getrocknetem Blut und Blutverdünnungen 1:100 000 erhalten wurden. Wie ersichtlich, ergab das Spechtsche Reagens eine maximale Lumines-

zenzintensität von nur $\phi_m = 110$ bei einer Intensität des Selbstleuchtens von $\phi = 60$. Das Selbstleuchten des Reagens wurde also durch den Zusatz der Blutlösung etwa auf das Doppelte erhöht. Bei der Verwendung des Reagens mit NaOH wurde bei nichtwahrnehmbarem Selbstleuchten eine maximale Lumineszenzintensität bei Zusatz der Blutlösung von $\phi_m = 990$ erhalten. Die entsprechenden Lichtsummen sind für das

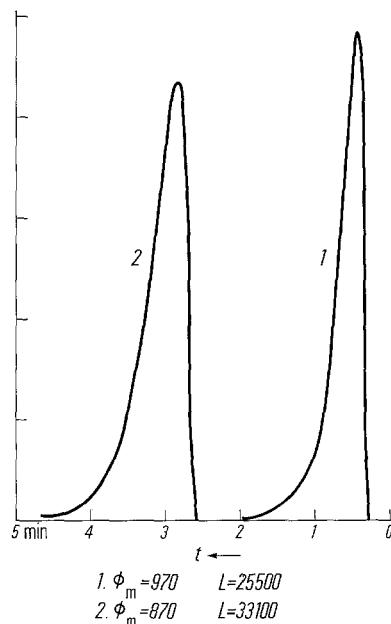
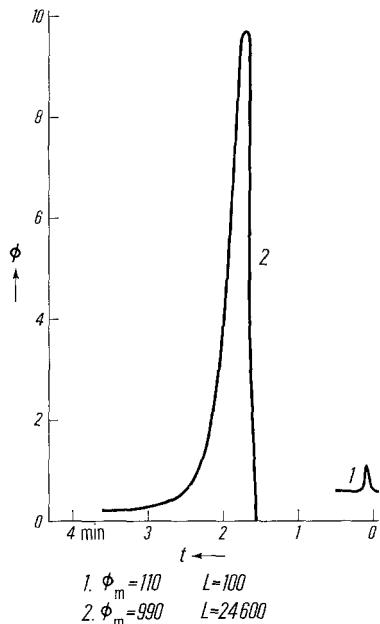


Abb. 3. Intensität-Zeitkurven (ϕ -t) der Chemilumineszenz des Luminols bei Zusatz von Lösungen (1:100 000) getrockneten Blutes. Kurve 1 Reagens mit Na_2CO_3 nach SPECHT, Kurve 2 Reagens mit NaOH

Abb. 4. Vergleich der Intensität-Zeitkurven (ϕ -t) der Chemilumineszenz des Luminols bei Zusatz von Blutlösungen 1:100 000 von angetrocknetem Blut (Kurve 1) und Frischblut (Kurve 2)

Reagens mit Na_2CO_3 $L = 100$ und für unser Reagens $L = 24600$. Es ist dabei wesentlich, daß bei Verwendung des Reagens mit NaOH das Lumineszenzleuchten länger dauert, womit die Sicherheit des Blutspurenachweises sehr erhöht wird.

Die Abb. 4 zeigt unter gleichen Bedingungen erhaltene Lumineszenzcurven (Blutlösung 1:100 000), von welchen sich die erste (1) auf getrocknetes Blut, die zweite (2) aber auf Frischblut bezieht. Es ist ersichtlich, daß durch das Trocknen des Blutes die maximale Lumineszenzintensität unwesentlich zunimmt ($\phi_m = 970$ gegen $\phi_m = 870$ für Frischblut), während die Lichtsumme durch Verkürzung der Leuchtdauer wesentlich abnimmt ($L = 22500$ gegen $L = 33100$ für Frischblut).

Durch Verwendung von angetrocknetem Blut, bei völlig gleichen Versuchsbedingungen, wird die maximale Intensität der Chemiluminescenz um etwa 10% erhöht, die Lichtsumme jedoch um 23% herabgesetzt. Für den qualitativen Nachweis von Blutspuren ist es aber gleichgültig, ob es sich um angetrocknete oder frische Blutspuren handelt. Diese Feststellung ist deshalb wichtig, weil die Blutspuren in Wasser, z. B. im Waschwasser blutbefleckter Hände, den Blutfarbstoff vorwiegend als Hämoglobin enthalten und sich nur allmählich Methämoglobin bildet.

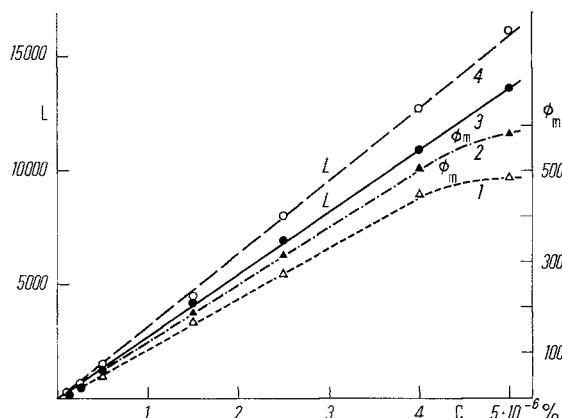


Abb. 5. Die maximale Luminescenzintensität (ϕ_m) und die Lichtsumme (L) als Funktion der Blutkonzentration. Kurven 1 und 3 für Frischblut, Kurven 2 und 4 für angetrocknetes Blut

Was die Stabilität und Verwendbarkeit des Luminolreagens mit NaOH betrifft, so haben wir festgestellt, daß das gebrauchsfertige (verdünnte) Reagens einige Tage verwendbar ist. Nach 4 Tagen hatte es allerdings nur etwa $1/4$ seiner Aktivität beibehalten. Die Stammlösungen sind dagegen praktisch unbegrenzt haltbar. Das Reagens nach SPECHT mit Na_2CO_3 war nach 4 Tagen vollkommen inaktiv.

Es war nicht unwesentlich festzustellen, wie sich die maximale Luminescenzintensität mit der Blutkonzentration in einem größeren Konzentrationsbereich ändert. Die Abb. 5 zeigt zwei Kurven dieser Funktion, die mit Frischblut (1) bzw. mit angetrocknetem Blut (2) erhalten wurden. Es ist ersichtlich, daß sich fast lineare Beziehungen ergaben. Nur bei großen Blutkonzentrationen wurden etwas kleinere Intensitätswerte gemessen, als der Linearität entspricht. Der verwendete Konzentrationsbereich (% Blut in der lumineszierenden Lösung) umfaßte bei diesen Versuchen Blutverdünnungen von 1:20 000 000 bis 1:100 000.

In der gleichen Abb. 5 ist auch die Abhängigkeit der Lichtsummen der Luminescenz von der Blutkonzentration graphisch dargestellt für Frischblut (3) und für angetrocknetes Blut (4). In beiden Fällen wurde

eine gute Linearität festgestellt. Es ist auch aus diesen Versuchen ersichtlich, daß bei gleichen Konzentrationen Frischblut immer höhere Werte der Lichtsumme und niedrigere Werte der maximalen Luminescenzintensität ergibt als angetrocknetes Blut. Angetrocknetes Blut ergibt also immer eine etwas hellere, aber kürzere Chemiluminescenz als Frischblut.

Aus den beschriebenen Versuchsergebnissen geht klar hervor, daß das angeführte Luminolreagens mit Natronlauge sich besonders gut

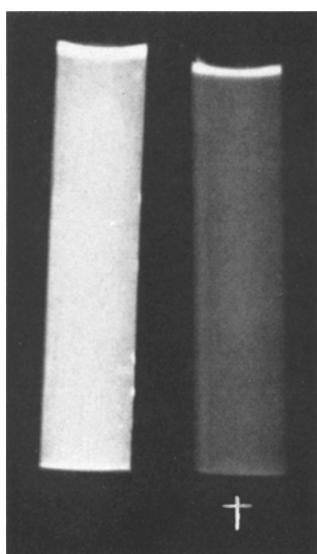


Abb. 6. Photographie der Chemiluminescenz des Luminols bei Anwesenheit von Blutlösung ohne Urin und bei Zusatz (+) von einigen Tropfen Urin

zum Nachweis von Blutspuren eignet. Dieses Reagens verleiht dem Blutspuren nachweis eine außerordentlich große Empfindlichkeit, und er wird dadurch spezifisch für Blut. Es konnte nämlich kein Stoff gefunden werden, der auch nur annähernd in solchen extremen Verdünnungen die Luminescenz des Luminols hervorzurufen vermag als Blut bzw. Hämoglobin (WEBER und MIKULIČIĆ).

Die Wirkung von Urin auf den Blutnachweis

Die Zahl der Stoffe, die die Chemiluminescenz des Luminols löschen, ist verhältnismäßig groß (WEBER, PROCHÁZKA und ŠPOLJARIĆ, WEBER und KOSTELAC, WEBER und KRAJČINOVIC). Da es sich aber meist um synthetische Stoffe handelt, ist ihre Anwesenheit in Blutspuren sehr

unwahrscheinlich. Für den gerichtsmedizinischen Blutspuren nachweis ist es jedoch wesentlich, daß Urin die Chemiluminescenz des Luminols sehr wirksam löscht (WEBER und FRKETIĆ). Die Abb. 6 zeigt die Photographie von zwei Eprouvetten mit identischen lumineszierenden Luminollösungen, von welchen einer jedoch einige Tropfen Urin hinzugefügt wurden. Eine deutliche Lösung der Chemiluminescenz durch den Urin kann leicht festgestellt werden. Aufgenommen wurde im Eigenlicht der Luminescenz.

Einige quantitative Messungen über den Einfluß des Urins auf die Luminescenz ergaben Werte für die maximale Intensität und für die Lichtsumme in Abhängigkeit von der Urinkonzentration, die in der Abb. 7 graphisch dargestellt sind. Die Messungen beziehen sich auf getrocknetes Blut bei einer Verdünnung von 1:2000000 im Reaktionsgemisch. Es ist ersichtlich, daß Urin schon in einer Konzentration von

nur 1% im Reaktionsgemisch sowohl die maximale Intensität als auch die Lichtsumme der Luminescenz ganz wesentlich herabzusetzen vermag. Blutspuren, die etwa mit Urin überdeckt wurden, sind demzufolge dem Nachweis mit der Luminolreaktion nur schwer zugänglich.

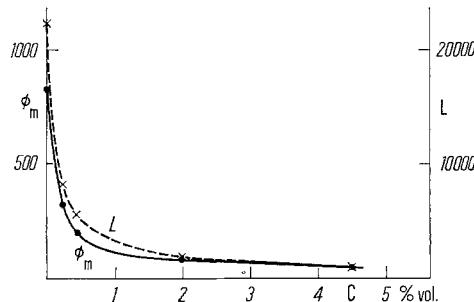


Abb. 7. Die maximale Luminescenzintensität (ϕ_m) und Lichtsumme (L) als Funktion der Urinkonzentration (c)

Andererseits kann man solche Versuche — also Löschversuche der Chemiluminescenz des Luminols — zum indirekten Nachweis von Urin heranziehen.

Der Nachweis von Methämoglobin und Kohlenoxydhämoglobin mit der Luminolreaktion

Es wurde schon darauf hingewiesen, daß das Luminolreagens mit NaOH beim Blutspuren nachweis etwa in gleicher Weise mit Oxyhämoglobin und Methämoglobin reagiert. Dasselbe wurde auch für Kohlen-

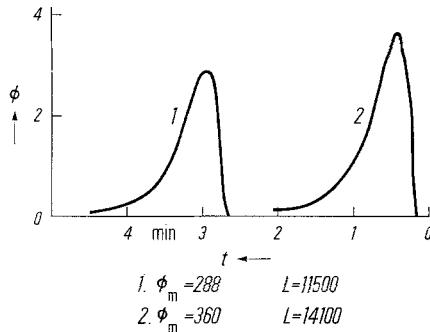


Abb. 8. Vergleich der Intensität-Zeitkurven ($\phi-t$), die bei sonst gleichen Versuchsbedingungen mit Frischblut (Kurve 1) und mit Kohlenoxydblut (Kurve 2) erhalten wurden

oxydhämoglobin festgestellt. Die Abb. 8 zeigt zwei Lumineszenzkurven, von welchen sich eine (1) auf Frischblut und die andere (2) auf Blut, das mit Kohlenoxyd gesättigt wurde, bezieht. Die Wirkung des Kohlenoxydhämoglobins ist offenbar intensiver (höhere ϕ_m - und L -Werte),

der Unterschied ist aber nicht so groß, daß er zur Unterscheidung der beiden Hämoglobinderivate dienen könnte.

Es wurde aber festgestellt, daß man mit einem Luminolreagens, das statt Natronlauge in gleicher Konzentration Natriumcarbonat enthält, Oxyhämoglobin von Methämoglobin und Kohlenoxydhämoglobin unterscheiden kann. Zu diesem Zweck wurde das oben angeführte Reagens nur insofern geändert, daß statt NaOH jeweils Na_2CO_3 in gleicher Konzentration sowohl für die Stammlösung I (21,2 g wasserfreies Na_2CO_3 in 500 ml dest. Wasser), als auch zum Auflösen des Luminols in der Stammlösung III verwendet wurde.

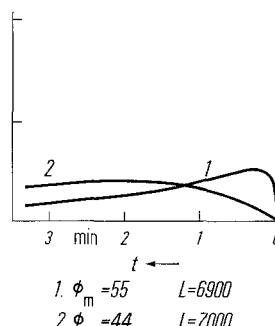
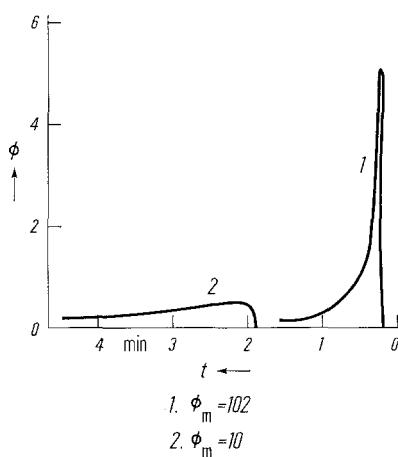


Abb. 10

Abb. 9. Vergleich der Intensität-Zeitkurven ($\phi-t$), die bei sonst gleichen Versuchsbedingungen mit dem Carbonat-Luminolreagens und mit angetrocknetem Blut (Kurve 1) bzw. mit Frischblut (Kurve 2) erhalten wurden

Abb. 10. Vergleich der Intensität-Zeitkurven ($\phi-t$), die mit dem Carbonat-Luminolreagens und mit Frischblut 1:1000 (Kurve 1) bzw. mit Kohlenoxydblut 1:1000 (Kurve 2) erhalten wurden

Mit dem so erhaltenen Luminolreagens mit Natriumcarbonat, das sich wesentlich vom Spechtschen Reagens unterscheidet, konnten wir die Unterscheidung der erwähnten Hämoglobinderivate vornehmen. Die Abb. 9 zeigt zwei Lumineszenzkurven, von welchen die eine (1) mit ge trocknetem Blut (Met-Hb) und die andere mit Frischblut ($\text{O}_2\text{-Hb}$) bei Verwendung des angeführten Carbonat-Luminolreagens erhalten wurde. Die Blutverdünnung im Reaktionsgemisch betrug jeweils 1:40 000. Es ist ersichtlich, daß die Formen dieser Kurven grundsätzlich verschieden sind. Angetrocknetes Blut ergibt ein helles Aufleuchten, das sehr rasch abklingt, während die Lumineszenz bei Anwesenheit von Frischblut wesentlich schwächer ist, aber nur allmählich abnimmt. Auch bei visuellen qualitativen Versuchen ist dieser Unterschied im Intensitätsverlauf der Lumineszenz wahrnehmbar.

Will man das Luminolreagens mit Carbonat zur Unterscheidung von Oxyhämoglobin und Kohlenoxydhämoglobin verwenden, so ist zunächst bei direkter Wirkung dieser Stoffe auf die Luminolreaktion kein wesentlicher Unterschied feststellbar. Die Abb. 10 zeigt zwei Kurven, von welchen die eine (1) mit Oxyhämoglobin (Blutverdünnung 1:1000), die andere (2) aber mit Kohlenoxydhämoglobin gleicher Konzentration erhalten wurde. Wie ersichtlich, ist der zeitliche Intensitätsverlauf der Luminescenz in beiden Fällen etwas verschieden, die maximalen Intensitätswerte und die Lichtsummen sind aber annähernd dieselben. Werden aber solche Blutproben angetrocknet, dann in Wasser gelöst und die Versuche unter gleichen Bedingungen wiederholt, so sind wesentliche Unterschiede festzustellen. Die Abb. 11 zeigt zwei Kurven, von welchen sich die mit 1 bezeichnete auf angetrocknetes normales Blut und die mit 2 bezeichnete auf angetrocknetes, mit Kohlenoxyd gesättigtes Blut bezieht. Im ersten Falle bildet sich offenbar viel Methämoglobin, das mit dem Reagens bei Anwesenheit von Carbonat eine intensive Chemiluminescenz ergibt, während beim Anrocknen von Kohlenoxydblut kein oder nur wenig Methämoglobin gebildet und nur eine schwache Luminescenz erhalten wird.

Es ist nicht anzunehmen, daß der geschilderte Methämoglobin- und Kohlenoxydhämoglobinnachweis mit dem Luminol-Carbonat- Reagens eine besondere praktische Bedeutung haben kann. Die Ergebnisse der angeführten Versuche sind aber in gegebenen Fällen, z. B. beim Prüfen von angetrockneten Spuren von Kohlenoxydblut mit der Luminolreaktion, zu berücksichtigen.

Zusammenfassung

Es wurde die Zusammensetzung eines Luminolreagens mit Natronlauge angegeben, das sich sehr gut zum Nachweis forensisch wichtiger Blutspuren eignet. Angetrocknetes oder Frischblut kann mit Hilfe des angeführten Reagens bis zu Verdünnungen 1:10000000 sicher durch die gut sichtbare Chemiluminescenz des Luminols nachgewiesen werden. Die durch die Blutspuren verursachte Chemiluminescenz des Luminols kann sehr genau photoelektrisch gemessen und registriert werden.

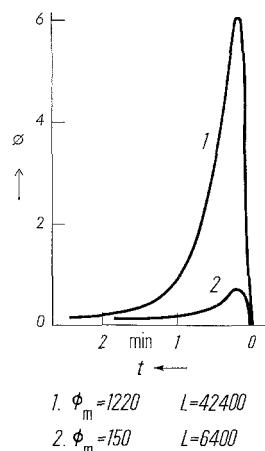


Abb. 11. Vergleich der Intensität-Zeitkurven (ϕ - t), die mit dem Carbonat-Luminolreagens und mit angetrocknetem Normalblut (Kurve 1) bzw. mit angetrocknetem Kohlenoxydblut (Kurve 2) erhalten wurden.
Blutverdünnungen 1:1000

Zwischen der maximalen Luminescenzintensität (\mathcal{O}_m) bzw. der Lichtsumme (L) und der Blutkonzentration besteht in weiten Grenzen eine lineare Beziehung.

Die Stammlösungen für das Luminolreagens sind monatelang haltbar, und das gebrauchsfertige Reagens zeigt bei sorgfältiger Bereitung keine Eigenluminescenz. Es ist auch im verdünnten gebrauchsfertigen Zustand einige Tage haltbar und verwendbar.

Urin löscht in großem Maße die Chemiluminescenz des Luminols beim Blutnachweis. Diese Erscheinung stört beim Spurenachweis von Blut, kann aber zum Nachweis von Urin herangezogen werden.

Die Chemiluminescenz des Luminols kann auch zum Unterscheiden des Oxyhämoglobins von Methämoglobin und Kohlenoxydhämoglobin verwendet werden.

Literatur

- ALBRECHT, H. O.: Über die Chemilumineszenz des Aminophthalhydrazids. *Z. phys. Chem.* **136**, 321 (1928).
- ÉTIENNE, A.: Heterocycles hexatomiques avec deux atomes d'azote. V. GRIGNARD, *Traité de chimie organique*, tome XX, p. 1150ff. Paris: Masson & Cie. 1953.
- GLEU, K., u. K. PFANNSTIEL: Über 3-Aminophthalsäurehydrazid. *J. prakt. Chem.* **146**, 137 (1936).
- GOLDENSON, J.: Detection of nerve gases by chemiluminescence. *Analyt. Chem.* **29**, 877 (1957).
- MATKOVÍC, J., u. K. WEBER: Über die Luminescenz des Luminols. XIII. Über den Wirkungsmechanismus von Nervengiften auf die Chemilumineszenz. [Kroatisch.] *Arh. Hig. Rada* **15**, 141 (1964).
- SCHWAB, G. M., u. F. ROST: Fermentmodelle. *Handbuch der Katalyse*, Bd. III, S. 572. Wien: Springer 1941.
- SCHWERD, W.: Der rote Blutfarbstoff und seine wichtigsten Derivate, S. 30. Lübeck: Max Schmidt-Römhild 1962.
- SPECHT, W.: Die Chemilumineszenz des Hämins, ein Hilfsmittel zur Auffindung und Erkennung forensisch wichtiger Blutspuren. *Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med.* **28**, 225 (1937). *Angew. Chem.* **50**, 155 (1937).
- WEBER, K.: Die Wirkung von Fremdstoffzusatz auf die Lumineszenz des Luzigenins. I. *Z. phys. Chem. B* **50**, 100 (1941).
- Über die Luminescenz des Luminols. I. Einfluß der Azidität und der Wirkung von Fremdstoffzusatz auf die Fluoreszenz des Luminols. *Ber. dtsch. chem. Ges.* **75**, 565 (1942).
- , and J. FRKETIĆ: The quenching effect of urine on the chemiluminescence of luminol. *Arh. Hig. Rada* **4**, 1 (1953).
- , Lj. HULIĆ u. M. MRAZOVĆ: Über die Lumineszenz des Luminols. IX. Die katalytische Wirkung des Isopestox auf die Chemilumineszenz des Luminols und die Inhibition dieser Reaktion. [Kroatisch.] *Arh. Hig. Rada* **9**, 325 (1958).
- , u. R. KOSTELAC: Eine sehr wirksame Inhibition der Luminolreaktion. *Croat. Chem. Acta* **28**, 33 (1956).
- , u. M. KRAJČINOVĆ: Katalyse der Chemilumineszenz des Luminols mit komplex gebundenem Kupfer. *Ber. dtsch. chem. Ges.* **75**, 2051 (1942).
- , u. J. MATKOVÍC: Über die Lumineszenz des Luminols. XIV. Die Wirkung von Halogeniden auf die Chemilumineszenz des Luminols. [Kroatisch.] *Arh. Hig. Rada* **15**, 151 (1964).

- WEBER, K., u. V. MIKULIĆ: Der Blutnachweis mit der Luminolreaktion. [Kroatisch.] Arh. Hig. Rada **10**, 101 (1959).
- , Ž. PROCHÁZKA u. J. ŠPOLJARIĆ: Die Wirkung von Fremdstoffzusatz auf die Luminolreaktion. Croat. Chem. Acta **28**, 25 (1956).
- WEGLER, R. J.: Chemilumineszenz cyclischer Hydrazide. J. prakt. Chem. **148**, 135 (1937).
- WHITE, E. H.: The chemiluminescence of luminol. Light and life, p. 183. Baltimore: J. Hopkins Press 1961.
- WILHELMSEN, P. C., R. LUMRY, and H. EYRING: The luminescence of biological systems, p. 75. Washington 1955.

Prof. Dr. K. WEBER
Zagreb, Jugoslawien, Šalata 11