

Dünnschichtchromatographische Untersuchungen an vitalen und postmortalen Blutseren*

WOLFGANG LAVES und ASTRID WINKLER

Institut für gerichtliche Medizin und Versicherungsmedizin der Universität München
(Vorstand: Prof. Dr. WOLFGANG LAVES)

Ausgehend von den in dieser Zeitschrift veröffentlichten Arbeiten über die spektrochemische Differenzierung vitaler, agonaler und postmortaler menschlicher Blutseren (W. LAVES), wurden weitere Untersuchungen zum gleichen Problem unter Anwendung der Dünnschichtchromatographie in Angriff genommen. Über die ersten Ergebnisse hatten LAVES und CORELL 1965 berichtet. Es zeigen sich nämlich bei dünnschichtchromatographischer Auftrennung von Blutserumextrakten lebender Personen und Verstorbener charakteristische Unterschiede. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit Untersuchungen über die Ursachen der beobachteten Befunde.

Untersuchungsgut

Blutproben von lebenden gesunden Personen wurden mit Venülen entnommen. Nach Zentrifugieren wurde das Serum abgehebert. Leichenblut wurde in Fällen gewaltsamen Todes aus der unteren Hohlvene, aus Körperhöhlenblutungen und aus peripheren Venen möglichst innerhalb von 12—24 Std nach Todeseintritt gelegentlich der Obduktionen entnommen und sofort abzentrifugiert. Es wurden zur weiteren Untersuchung zunächst nur klare nicht hämolytische Seren verwendet.

Untersuchungstechnik

1. Je 1 ml Serum wurden mit 3 ml einer 10%igen Trichloressigsäurelösung (TCIE) in Kunststoffröhren versetzt, die Mischung nach Umschütteln bei 10000 Umdrehungen in einer *Phywe*-Zentrifuge abgeschleudert und die überstehende klare Flüssigkeit dekantiert. Diese diente zur weiteren Untersuchung. Der Bodenkörper wurde verworfen.

2. *Dünnschichtchromatographie*. Zur Auftragung auf 20 × 20 cm Glasplatten kam die Kieselgelaufschwemmung unter Zusatz von Gips nach STAHL (K. RANDERATH, 1962, Dünnschichtchromatographie S. 23).

Die Platten wurden bei Zimmertemperatur über Nacht an der Luft getrocknet. Dann erfolgte mit Hilfe einer *Hamilton*-Spezial-Spritze die

* Auszugsweise vorgetragen gelegentlich der Tagung der British Association in Forensic Medicine, London 20. 11. 1965.

Auftragung von je 5 μ l der TCIE-Extrakte mit Hilfe einer Plexiglasvignette auf die Startlinie. Die Platten wurden dann in rechteckige Glaströge, die mit einem Gemisch aus 96%igem Äthylalkohol (35 Vol.) und mit konzentrierter (25%iger) Ammoniaklösung (15 Vol.) beschickt waren, gestellt. Die Distanz: Startlinie, Frontlinie entsprach genau 10 cm. Die Tröge müssen für jeden Versuch mit *frisch* angesetztem Laufmittel beschickt werden.

Nach dem Herausnehmen der Platten wurden diese in einem warmen Luftstrom (Föhn), waagerecht liegend, getrocknet und dann mit dem folgenden Reagens: Ninhydrin-Kupfernitrat für Aminosäuren nach BRENNER (s. Anfärbereagentien für Dünnschicht- und Papier-Chromatographie, E. Merck AG., Darmstadt, Reagens Nr. 165, S. 40) besprüht.

Die *Entwicklung* der Chromatogramme erfolgte im Thermostat bei 110° C. Nach Abkühlung wurden die Flecken sofort umrandet und mit Hilfe eines Rank-Xerograph, Typ Rank-Xerox 914 Copier, kopiert, da die Flecken verhältnismäßig rasch verblassen.

Befunde

1. Das wichtigste Ergebnis, das in zahlreichen Versuchen regelmäßig reproduzierbar war, bestand in den Unterschieden der Zahl der Flecken, welche in Chromatogrammen der TCIE-Extrakte vitaler und postmortaler Blutseren auftreten (Abb. 1).

Vitale Blutserumextrakte sind in der Regel durch einen, manchmal auch durch zwei Flecken nahe der Laufmittelfront gekennzeichnet. Im Gegensatz dazu zeigen die Chromatogramme frischer Leichenserumextrakte in der Regel sechs Flecken. Die Farbe der Flecken ist etwas unterschiedlich, in der Regel rötlichviolett; ein Fleck zeigt eine orangeartige Tönung.

2. *Über die Ursachen der Unterschiede zwischen vitalen und postmortalen TCIE-Blutserumextrakten.* Es wurde, wie erwähnt, Ninhydrin als Sprühreagens verwandt. Das Auftreten der Flecken legte die Annahme nahe, daß diese auf der Anwesenheit freier Aminosäuren (in unterschiedlichen Konzentrationen) beruhen konnten.

Es wurden daher Lösungen von Testaminosäuren (Merck) in 10%iger TCIE-Säure in geeigneten Konzentrationen hergestellt. Mit diesen Lösungen wurden parallel zu vitalen und postmortalen Blutserumextrakten Chromatogramme — wie oben beschrieben — angefertigt. In der Abb. 2 sind die wichtigsten Resultate wiedergegeben. Im rechten Teil der Abbildung finden sich sechs Chromatogramme postmortaler Serumextrakte. Zwischen diesen liegen die Flecken, welche durch Methionin, Threonin, Alanin, Valin, Glykokoll und Glutaminsäure verursacht wurden.

Die durch die Aminosäuren verursachten Flecken befinden sich jeweils in Höhe eines Flecks der postmortalen Serumextrakte. Es ist

jedoch darauf hinzuweisen, daß die durch Threonin und Alanin verursachten Flecken etwa in gleicher Höhe lokalisiert sind, so daß es nicht

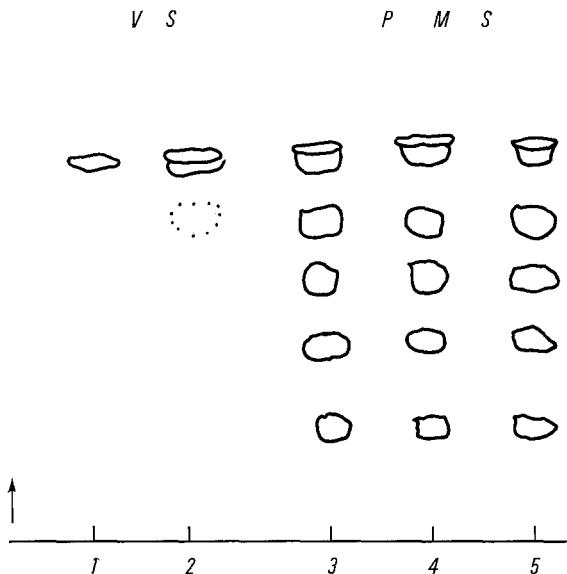


Abb. 1. 1 Chromatogramm eines vitalen Blutserum-TCIE-Extraktes = VS. 2 Chromatogramm eines vitalen Blutserum-TCIE-Extraktes = VS. 3-5 Chromatogramme von drei Leichenblutserum-TCIE-Extrakten = PMS

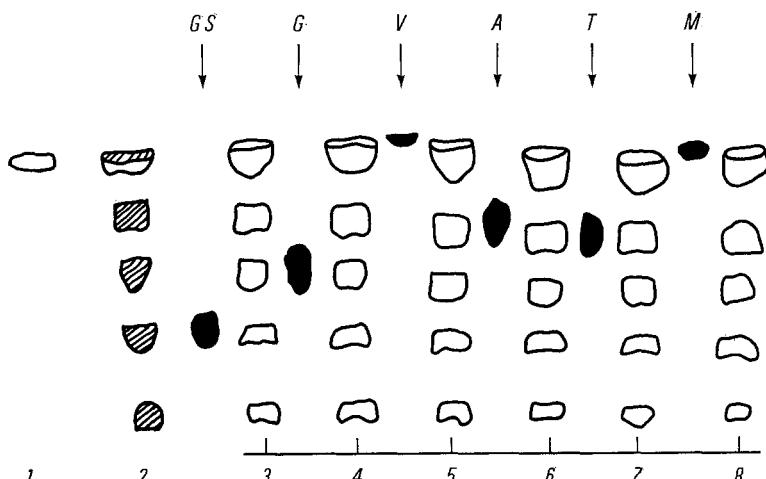


Abb. 2. 1 Chromatogramm eines vitalen Blutserum-TCIE-Extraktes. 2 Chromatogramm des gleichen Extraktes nach Zusatz der Aminosäuren: Lysin, Glutaminsäure, Glykokoll, Alanin, Threonin, Valin und Methionin. 3-8 Chromatogramme postmortaler Blutserum-TCIE-Extrakte. Dazwischen die Chromatogramme folgender Aminosäuren in TCIE-Lösung (10%ig). GS Glutaminsäure; G Glykokoll; V Valin; A Alanin; T Threonin; M Methionin

unterscheidbar ist, welche Aminosäuren den Fleck verursachen. Das gleiche betrifft die Lokalisation des Methionins und Valins.

Auf der linken Seite der Abb. 2 findet sich das Chromatogramm eines TCIE-Extraktes eines normalen vitalen Blutserums (Nr. 1). Das 2. Chromatogramm (mit *gestrichelten* Flecken) wurde dadurch erhalten, daß die oben angeführten Aminosäuren und zusätzlich noch Lysin zu dem Extrakt des vitalen Serums hinzugefügt worden waren. Man erkennt, daß die Flecken in sehr guter Übereinstimmung mit denjenigen

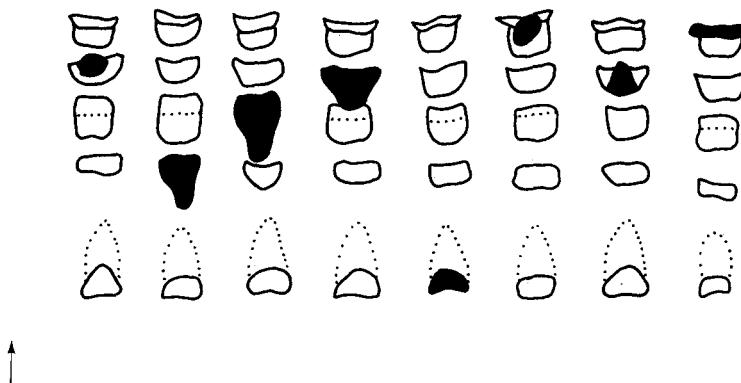


Abb. 3. Chromatogramme von acht Leichenblutserum-TCIE-Extrakten nach Zusatz folgender Aminosäuren: 1. Histidin; 2. Glutaminsäure; 3. Glykokoll; 4. Alanin; 5. Lysin; 6. Valin; 7. Threonin; 8. Methionin

der einzelnen Aminosäurechromatogramme und auch mit denjenigen der postmortalen Serumextrakte stehen.

Ein weiterer Versuch ist in der Abb. 3 wiedergegeben: Es handelt sich um die Chromatogramme von acht Leichenserenextrakten. Zu diesen war jeweils eine der genannten Aminosäuren hinzugefügt worden. Dieser Zusatz bedingte jeweils eine intensivere und dunklere Faroreaktion im Bereich der entsprechenden Flecken im Vergleich zu dem durch den Serumextrakt allein verursachten Fleck. Es erfolgt also eine additive Verstärkung des jeweils durch die zugesetzte Aminosäure verursachten Fleckens des postmortalen Serumextraktes.

Das Chromatogramm 1 zeigt die Lokalisation des hinzugefügten Histidins. Auf den Chromatogrammen 2—8 sind die dunkleren Flecken durch Glutaminsäure, Glykokoll, Alanin, Lysin und Methionin durch Schwärzung gekennzeichnet.

Die gleiche Untersuchungstechnik wurde in den Versuchen der Abb. 4 und 5 angewandt. Hier wurde auch das Verhalten des Zusatzes

von Leucin, Serin (Abb. 4), ferner von Prolin, Histidin, Arginin, Asparaginsäure, Tryptophan und Tyrosin geprüft. Man erkennt, daß eine

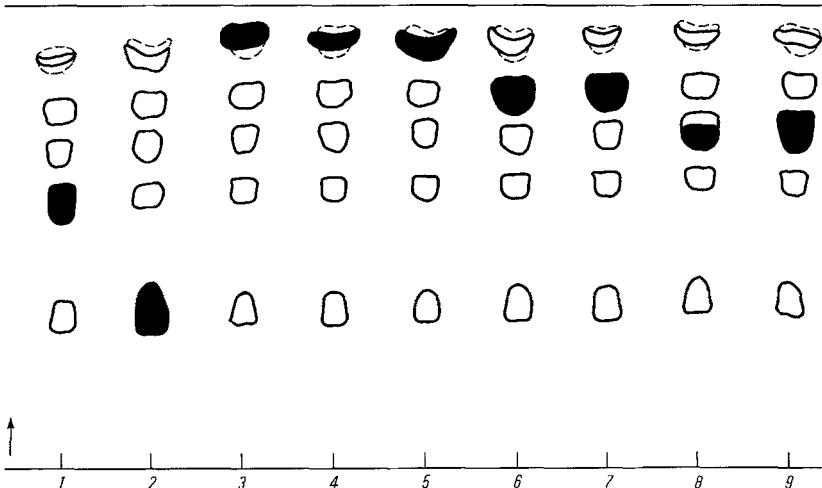


Abb. 4. Chromatogramme von neun Leichenblutserum-TCIE-Extrakten nach Zusatz von 1. Glutaminsäure; 2. Lysin; 3. Leucin; 4. Methionin; 5. Valin; 6. Threonin; 7. Alanin; 8. Serin; 9. Glykokoll



Abb. 5. Chromatogramme von sechs Leichenblutserum-TCIE-Extrakten nach Zusatz von 1. Prolin; 2. Histidin; 3. Arginin; 4. Asparaginsäure; 5. Tryptophan; Tyrosin

Reihe verschiedener Aminosäuren Koinzidenzen in gleichen Bereichen der Chromatogramme bzw. in den gleichen Flecken der Leichenserum-extrakte zeigen.

Es läßt sich somit die Art der Aminosäure, welche einen bestimmten Fleck eines Leichenserum-TCIE-Extraktes verursacht, nicht exakt ermitteln.

Diese Versuche sind kein exakter chemischer Beweis dafür, daß die geprüften Aminosäuren tatsächlich die einzige Ursache der in den Chromatogrammen vitaler, vor allem aber postmortaler Blutserumextrakte auftretenden Flecken sind. Immerhin ist dieses wohl in hohem Grade wahrscheinlich. Weitere Untersuchungen zu diesen Fragen wurden in Angriff genommen.

3. Die Ursache der Unterschiede zwischen vitalen und postmortalen Blutserumextrakten, sofern sie dünnschichtchromatographisch darstellbar sind:

Es wurde geprüft, ob *quantitative Unterschiede* in der Konzentration der freien Aminosäuren hierfür in Betracht kommen. Hierfür haben wir vitale Blutserumextrakte etwa zehnfach *konzentriert*. Die Konzentrate wurden in gleicher Weise chromatographiert, wie oben beschrieben. Bei gleichzeitiger Auftragung dieser vitalen Serumextraktkonzentrate und postmortaler Serumextrakte ergab sich eine weitgehende Übereinstimmung zwischen beiden. Es kommt also offenbar in der Agonie oder unmittelbar nach dem Tode zum Auftreten höherer Konzentrationen an freien Aminosäuren im Blutserum.

Schnelltest zur Differenzierung vitaler und postmortaler Blutseren

In der Praxis ist es oft wichtig, möglichst rasch eine Aussage darüber machen zu können, ob eine Körperhöhlenblutung noch bei Lebzeiten oder erst nach dem Tod entstanden ist. Hierfür hat sich uns der folgende *Ninhydrin-Schnelltest* bewährt.

Die Blutserumextrakte und auch die Kieselgelplatten werden, wie oben beschrieben, vorbereitet.

Nunmehr werden abwechselnd je 5 µl des fraglichen Extraktes und Testextrakte vitaler und postmortaler Blutseren auf die Kieselgelschicht mit Hilfe einer *Hamilton-Spritze* aufgetragen und in einem warmen Luftstrom bei waagerechter Lagerung der Platte getrocknet. Auf jeden der angetrockneten Extrakttropfen werden, wiederum mit Hilfe der *Hamilton-Spritze*, je 5 µl des *Ninhydrin-Kupfernitratreagens* aufgetropft und neuerlich getrocknet. Nach Einbringen in den Thermostaten entwickelt sich bei 110° C folgende *charakteristische Farbreaktion*:

Blutserumextrakte lebender Personen reagieren mit einer gelblichen, Extrakte von postmortalen Blutseren reagieren mit einer dunklen röthlichvioletten Farbe.

Seren aus Körperhöhlenblutungen, die durch innere Verblutung zum Tode geführt haben, verhalten sich wie Seren lebender Personen.

Zusammenfassung

Es wird über dünnenschichtchromatographische Untersuchungen an vitalen und postmortalen Blutseren berichtet. Es wurden charakteristische Unterschiede in der Zahl der in den Chromatogrammen auftretenden Flecken beschrieben. Weiterhin wurde versucht, die Ursache der Flecken zu erklären. Es handelt sich sehr wahrscheinlich um Aminosäuren. Die Unterschiede zwischen vitalen und postmortalen Dünnenschichtchromatogrammen sind konzentrationsbedingt. Werden vitale Blutserumextrakte entsprechend (ca. zehnfach) eingeengt, so ergeben sich die gleichen Chromatogramme wie bei Leichenseren.

Es wird ein einfacher Ninhhydrin-Schnelltest zur Differenzierung vitaler und postmortaler Körperhöhlenblutungen beschrieben.

Diese Untersuchungen wurden in dankenswerter Weise von der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt.

Literatur

- LAVES, W., u. H. CORELL: Hémorragies vitales et postmortales. XXX^e Congr. Internat. de Médecine Légale et Sociale de Langue Française. 3. Mai 1965.
—, u. A. WINKLER: Thin layer chromatography of vital and postmortem bloodsera. Meeting of the Brit. Ass. in Forensic Medicine, London 20. November 1965.

Prof. Dr. W. LAVES

Institut für gerichtliche Medizin und Versicherungsmedizin
8 München 15, Frauenlobstraße 7