

(Aus dem Gerichtsärztlichen Institut der Universität Göttingen [Direktor: Prof. Dr. Lochte].)

## **Der Nachweis von Blut mit dem Fuld'schen Reagens Rhodamin in der gerichtlichen Medizin.**

Von

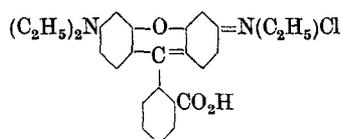
**Dr. med. Rudolf Alke.**

z. Z. Assistenzarzt im Marienhospital, Gelsenkirchen.

Von allen technischen Fragen, die an den Gerichtsarzt herantreten, hat die Untersuchung von Blutspuren und der Nachweis von Blut die größte Bedeutung; wenn es auch meist leicht ist, an frischen Blutflecken den Nachweis zu erbringen, so kann es sich doch schwierig gestalten, wenn es sich um ältere, durch Witterungseinflüsse bedingte oder chemische Veränderungen handelt. Seit langer Zeit hat man versucht, Mittel und Wege zu finden, um zum Ziele zu kommen. Man hat u. a. sogenannte Vorproben aufgestellt, d. h. Reaktionen, die bei positivem Ausfall die Gegenwart von Blut sehr wahrscheinlich machen, bei negativem Ausfall hingegen das Vorhandensein von Blut ausschließen. Es sind im Laufe der Jahrzehnte eine ganze Reihe von Vorproben aufgefunden. Bezüglich der Vorproben von van Deen, Schönbein, Kastle-Meyer, Adler, Schaer, Riegler, von Stork-Boas, Fleig wird auf die Lehrbücher der gerichtlichen Medizin, bezüglich der von Ganassini-Bellusi auf: *Archiv di Antropologia criminale, Psichiatria etc.* 1913, Heft 3, und der von Michel auf die *Chem. Zeitg.* vom 11. IV. 1911, Nr. 43, S. 389, und auf die *Ärztl. Sachverständigenzeitung* Nr. 21, 1913 (Lochte und Fiedler) hingewiesen.

Alle bisher bekannten Vorproben haben ihre Fehler und Mängel; es erscheint daher verständlich, wenn nach neuen, besseren Methoden gesucht wird. Fränkel führt nun in seinem 1918 erschienenen Buche: *Praktikum der med. Chemie einschl. der forensischen Nachweise für Mediziner und Chemiker*, eine neue Blutprobe an, die zuerst von E. Fuld angegeben ist. Es erschien uns der Mühe wert, dies Fuld'sche Reagens auf seine gerichtl.-med. Brauchbarkeit hin näher zu prüfen. Nach Fuld handelt es sich um einen Farbstoff Rhodamin. Im Jahre 1887 wurde dieser Farbstoff von der Badischen Anilin- und Sodafabrik in den Handel gebracht (v. Georgievics).

Das von Fuld angegebene Rhodamin ist das Chlorhydrat und trägt die Formel  $C_{23}H_{31}N_2O_3Cl$  oder



Nach den Angaben von E. Fuld wird das Reagens in folgender Weise hergestellt:

Man löst 0,2 g Rhodamin in 50 ccm Alkohol in einem Erlenmeyerkolben, kocht auf, setzt 5 g Zinkstaub hinzu und 4 ccm einer 10 proz. Natronlauge und schwenkt um. Bei weiterem Sieden erfolgt die Entfärbung augenblicklich. Nach dem Erkalten verkorkt man.

Von dieser alkoholischen Lösung gießt man nach Aufwirbeln von so viel Zinkstaub, daß die Lösung grau erscheint, in ein Reagensrohr, kocht auf und gibt die entfärbte Lösung zum gleichen Volum der zu untersuchenden, bereits mit einem Tropfen einer käuflichen 3 proz. Wasserstoffsperoxydlösung versetzten Lösung hinzu; je 1 ccm genügt. Es tritt Rotfärbung ein. In dieser Weise wurde von uns das Reagens hergestellt und zu Versuchen gebraucht. Von der entfärbten alkoholischen Lösung des Reagens wurde 1 ccm genommen und ein Tropfen einer 3 proz. Wasserstoffsperoxydlösung hinzugesetzt und umgeschüttelt. Das Reagens blieb unverändert. Hierauf wurde 1 ccm einer frischen Blutlösung genommen und dem ersten Gemisch zugesetzt: Es trat sofort eine Rotfärbung ein. Der Versuch wurde wiederholt mit dem Unterschiede, daß an Stelle der Blutlösung 1 ccm destilliertes Wasser genommen wurde. Dabei blieb das Gemisch farblos. Es ergab sich demnach:

- 1) Reagens +  $H_2O_2$  = ohne Reaktion;
- 2) Reagens +  $H_2O_2$  + Blut = rote Verfärbung;
- 3) Reagens +  $H_2O_2$  + Aq. dest. = ohne Reaktion.

Aus diesen Versuchen geht hervor, daß das Blut fähig ist, die Umsetzung derart vorzunehmen, daß eine rote Farbe auftritt. Bei diesem Vorgang wird die Leukoverbindung oxydiert, es stellt sich infolgedessen die ursprüngliche Färbung wieder ein. Über diese Fähigkeit des Blutes schreibt Benoit: „La plupart des auteurs — — ont attribué ce pouvoir oxydant du sang à une action purement diastatique.“

Es erhob sich nunmehr die Frage: Geht die Reaktion auch vor sich in saurer und alkalischer Lösung? Zu diesem Zwecke wurde die Blutlösung mit:

- a) 1 ccm 100proz. Essigsäure versetzt und dann die Reaktion in der angegebenen Weise vorgenommen; es zeigte sich Rotfärbung. Ein in das Gemisch eingeführtes blaues Lackmuspapier wurde rot;
- b) 1 ccm 10proz. Natronlauge versetzt und die Reaktion angestellt. Wiederum zeigte sich eine Rotfärbung des Gemisches. Rotes Lackmuspapier wurde im Gemisch blau.

Es ergibt sich also, daß die Reaktion in neutraler, saurer und alkalischer Lösung positiv ausfällt.

Es wurde nunmehr die Empfindlichkeit des Reagens geprüft. Zu diesem Zwecke wurde 1 ccm frisches Rinderblut mit destilliertem Wasser zu 10 ccm aufgefüllt; von dieser Verdünnung 1 : 10 wurde wiederum 1 ccm mit destilliertem Wasser auf 10 ccm gebracht, so daß eine Verdünnung von 1 : 100 entstand; die nächsten Lösungen wurden in analoger Weise hergestellt, so daß man Verdünnungen hatte:

- a) 1 : 10; b) 1 : 100; c) 1 : 1000; d) 1 : 10 000; e) 1 : 100 000;
- f) 1 : 1 000 000; g) 1 : 10 000 000; h) 1 : 100 000 000.

Von diesen Verdünnungen wurden je 2 ccm Blutlösung genommen und 1—2 Tropfen einer 3proz. käuflichen Wasserstoffsperoxyd-lösung hinzugesetzt. Dann wurde das Reagens aufgeschüttelt bis es grau erschien und 2 ccm davon genommen, die bis zur Entfärbung aufgekocht wurden. Diese wurden nun jedesmal zu den genannten Blutlösungen hinzugesetzt. Es zeigte sich, daß in den Lösungen von a—c eine ziemlich dunkelrote Färbung auftrat; von Lösung d ab nahm die Farbe mehr einen lilaroten Charakter an, was bis zur Lösung g zu verfolgen war. Eine „Inkubationszeit“ wie bei einigen anderen Reagentien war nicht zu beobachten, was auch Fuld angibt.

Die Grenze der Empfindlichkeit scheint bei 1 : 1 000 000 zu liegen, für gerichtliche Zwecke etwa bei 1 : 100 000. Aus den Versuchen geht hervor, daß das Fuld'sche Reagens auf Blut sehr empfindlich ist.

Zur Kontrolle wurde die Reaktion gleichzeitig mit destilliertem Wasser statt Blut vorgenommen. Hierbei zeigte sich, daß das Gemisch zunächst farblos blieb, nach einer Viertelstunde jedoch trat auch in den Kontrollen eine leichtrötliche Färbung auf, die sich im Verlaufe der nächsten 24 Stunden noch vertiefte; es ist daher notwendig, die Reaktion unmittelbar nach der Mischung auf Rotfärbung zu beobachten. Späteres Eintreten der Farbreaktion ist nicht beweisend.

Was die Intensität der Färbung betrifft, so läßt sich aus dieser die Menge des vorhandenen Blutes erschließen; bei größeren Blutmengen, wie in Verdünnungen 1 : 10 bis 1 : 100, war der Farbton so tief, daß fast kein Unterschied bestand; von weiteren Verdünnungen ab ging die Verfärbung von dunkelrot immermehr in hellrot über.

Während dünne Lösungen frischen Blutes zwei Absorptionsstreifen zwischen den Fraunhoferschen Linien D und E, also im Gelbgrün zeigen, zeichnet sich die dünne Rhodaminblutlösung durch einen dunklen, breiten Schatten im Gelbgrün aus; das nicht durch Zinkstaub reduzierte Reagens hat einen breiten Schatten im Gelbgrün, der über Grün noch hinausgeht. Das farblose Reagens verändert das Spektrum nicht.

In weiteren Versuchen wurde die Frage geprüft, ob die Reaktion als eine auf Blut spezifische angesehen werden kann. Hierzu wurden zunächst die verschiedensten Körperflüssigkeiten auf ihre Reaktionsfähigkeit hin untersucht:

Nicht pathologischer Urin gab keine Reaktion, ebensowenig ein eiweißhaltiger und zuckerhaltiger Urin; bluthaltiger reagierte dagegen prompt. Die Versuche wurden wieder so angestellt, daß je 2 ccm Harn, zu dem ein Tropfen Wasserstoffsuperoxyd gesetzt war, mit je 2 ccm des entfärbten Reagens vermischt wurden.

Speichel und Sperma gaben ebenfalls keine Reaktion.

Aus der Gallenblase eines frischgeschlachteten Rindes wurden mit einer Pravazschen Spritze einige ccm Galle entnommen; mit dieser wurde dann die Reaktion angestellt: Sie verlief negativ; wohl trat eine dunkle Verfärbung ein, die jedoch nicht als typische Reaktion angesprochen werden konnte; ein Kontrollröhrchen mit Blut zeigte deutlich den Unterschied in der Färbung. Zerkleinerte Gallensteine gaben ebenfalls keine Reaktion.

Bluthaltiges Pleuraexsudat reagierte sofort, blutfreies dagegen nicht. Mekonium gab negatives Resultat.

Ammenmilch zeigte positive Reaktion, wenngleich diese nicht so schnell einsetzte; in den Kontrollen mit destilliertem Wasser trat viel später erst die Verfärbung ein. Gekochte Milch reagierte ebenfalls positiv, allerdings noch etwas langsamer wie ungekochte; es wurden auch Versuche mit Milch ohne Zusatz von Wasserstoffsuperoxyd gemacht, die negativ verliefen. Nach Sartory fällt die Milchprobe auch mit dem Meyerschen Reagens positiv aus, wenn die Milch gekocht ist. Raudnitz und Batelli haben über die katalytische Wirkung der Milch berichtet; der erstere über Frauenmilch, der andere über Kuhmilch.

Verständlich erscheint, daß eitriges Sputum positiv reagiert, wenn man bedenkt, daß neben den weißen Blutkörperchen auch immer rote vorhanden sind. Schleimiger Auswurf zeigte negatives Resultat.

Weiterhin wurden Farbstoffe untersucht: Karbolfuchsin, Fuchsin, Phloroglucin und Eosin verhielten sich sowohl mit wie ohne Zusatz von Wasserstoffsuperoxyd negativ. Scharlachrot zeigte ohne Wasserstoffsuperoxyd schwarze Verfärbung; mit  $H_2O_2$  dagegen einen dunkel-

roten Farbenton, der dem der typischen ähnlich war; verglich man jedoch beide miteinander, so war ein Unterschied festzustellen: der erste neigte mehr nach dunkelrot hin, der andere nach hellrot.

Eine größere Bedeutung liegt in dem Verhalten des Reagens zu Rost, weil in der gerichtsarztlichen Praxis häufig dem Arzte die Frage vorgelegt wird, ob Rostflecke an Messern und Dolchen gleichzeitig Blutspuren enthalten. Um diese Frage zu klären, wurden Rostteilchen von einem verrosteten Blechstücke abgekratzt und auf Fließpapier gebracht; dann wurde ein Tropfen Wasserstoffsperoxyd zugesetzt und darauf das Reagens: Die Rostflecke blieben unverändert; die Reaktion war somit negativ.

Eisenchlorid gab sowohl mit wie ohne Zusatz von Wasserstoffsperoxyd positive Reaktion; Ferrisulfat, das in destilliertem Wasser aufgelöst wurde, gab mit dem Reagens eine rote Färbung, die ohne Zusatz von Wasserstoffsperoxyd noch tiefer war. Ferricyankali und Ferrocyankali reagierten in beiden Fällen positiv. Von Kaliumchromat gilt dasselbe wie von Eisenchlorid. Kaliumpermanganat zeigte sowohl mit als auch ohne Zusatz von Wasserstoffsperoxyd positives Resultat, wobei zu bemerken war, daß die erste Mischung schneller reagierte als die zweite, ohne  $H_2O_2$ ; ein leichter Niederschlag war dabei zu beobachten. Chlorkalk reagierte beide Male positiv. Kupfersulfat ergab mit Wasserstoffsperoxyd eine schmutziggraue, ohne  $H_2O_2$  eine hellblaue Verfärbung: also in beiden Fällen eine negative Reaktion.

Aus den angeführten Versuchen ergibt sich demnach, daß diese Stoffe entweder gar nicht, oder schon ohne Zusatz von Wasserstoffsperoxyd positiv reagieren; außerdem ist bei einzelnen auch der Farbenton und die Farbenveränderung doch etwas verschieden von der typischen Reaktion. Allerdings bedarf es schon einiger Erfahrung, um das immer richtig entscheiden zu können.

Einige anorganische Substanzen, die untersucht wurden, ergaben die Blutreaktion: so reagierten Natriumbicarbonat, Magnesiumsulfat und Bromkalium positiv, während ohne Zusatz von Wasserstoffsperoxyd das Gemisch negatives Resultat zeigte. Die positiv reagierenden Stoffe wurden nun gekocht, wobei zu sehen war, daß die rote Farbe bestehen blieb.

Ein Versuch mit physiologischer Kochsalzlösung verlief negativ.

Es wurden weiterhin verschiedene Objekte, wie sie insbesondere der Gerichtsarzt zu prüfen hat, näher untersucht. Menschenblut verhielt sich selbstverständlich genau so wie das bisher verwandte Rinderblut. Faules Blut, das seit acht Wochen im offenen Glase im Institut gestanden hatte, ergab positive Reaktion. Dasselbe Blut wurde eine Viertelstunde lang gekocht, auch hiermit erhielten wir dasselbe Resultat.

Um zu sehen, wie sich erhitztes Blut verhält, haben wir Blut, auf Watte getrocknet, eine halbe Stunde auf 100° im Thermostaten erhitzt; die Reaktionsfähigkeit hatte nicht gelitten. Dann wurde eingetrocknetes Blut eine Stunde lang auf 150° erhitzt; auch danach fiel die Prüfung positiv aus. Schließlich machten wir noch mit eingetrocknetem Blut, das auf 200° eineinhalb Stunde erhitzt war, den Versuch; auch dabei versagte die Reaktion nicht.

Es wurde weiterhin ein Kleidungsstück, das mit 12 Jahre altem Kaninchenblut durchtränkt war, untersucht; dabei zeigte sich sofort positive Reaktion. Die Anordnung des Versuches geschah folgendermaßen:

Glas a wurde mit einem Teilchen des genannten Kleidungsstückes beschickt und dann 2 ccm Essigsäure (100%) zugesetzt;

Glas b ebenso, nur statt Essigsäure wurde 10proz. Natronlauge genommen.

Beide Gläser wurden aufgeköcht und Wasserstoffsperoxyd und das Reagens hinzugesetzt; in beiden Fällen trat eine positive Reaktion ein; wurde Wasserstoffsperoxyd fortgelassen, so fiel der Versuch negativ aus.

Ferner wurde frisches und altes Blut mit Staub, Erde und Sand verrührt; auch hierbei versagte die Reaktion nicht.

Ebenso zeigten Blutspritzer auf getrocknetem Laub einen positiven Ausfall.

Es schien uns von Interesse zu sein, den Pflanzenfarbstoff Chlorophyll, der eine gewisse Verwandtschaft zum Blutfarbstoff haben soll (Diels), auf sein Verhalten gegenüber dem Reagens zu prüfen. Zu diesem Zwecke wurde ein grünes Pflanzenblatt zwischen weißem Fließpapier ausgequetscht; die dabei entstehenden grünen Flecke wurden mit dem Reagens übergossen, es trat keine Veränderung der Farbe ein; ebenso verlief der Versuch auch nach dem Zusatz von Wasserstoffsperoxyd negativ.

Schließlich wurde weißes Fließpapier selbst untersucht, wir erhielten dabei negatives Resultat.

Teichmannsche Häminkrystalle gaben positive Reaktion. Die Untersuchung gestaltete sich folgendermaßen:

Es wurden einige Krystalle auf Fließpapier gebracht, 2 Tropfen Wasserstoffsperoxyd zugesetzt; es entstand nach dem Zuffließenlassen von einem Tropfen Reagens eine intensive Rotfärbung; wurde Wasserstoffsperoxyd fortgelassen, so verlief die Reaktion negativ.

Bei Hämatoporphyrin trat ebenfalls eine rote Reaktion auf, die jedoch schwächer wie im vorigen Versuch war. Die Versuchsanordnung war dieselbe wie bei den Teichmannschen Häminkrystallen.

Der Versuch mit Hämatin zeigte ebenfalls positives Resultat. Die Versuchsanordnung war wiederum wie oben angeführt.

Es wurde ferner ein mit Blut beflecktes Kleidungsstück mit Filtrierpapier, das mit Essigsäure angefeuchtet war, bedeckt und ausgedrückt; dann wurde auf den Abdruck ein Tropfen Wasserstoffsperoxyd getropft und dazu  $\frac{1}{2}$  ccm Reagens gesetzt; es zeigte sich sofort eine rote Verfärbung. Kontrollproben ohne Blut verliefen resultatlos.

Außerdem wurde die Probe mit einem Knochenteilchen von einem viele Jahre alten Schädel angestellt; sie verlief positiv. Dieser Versuch ist insofern nicht ohne Interesse, als auch Benoit mit einem alten Schädel, der 26 Jahre lang im Laboratorium für gerichtliche Medizin aufbewahrt war, eine eindeutige Reaktion mit dem Kastle-Meyerschen Reagens erhalten konnte.

Nicht unerwähnt sollen noch einige Stoffe bleiben, die auch Benoit mit dem Kastle-Meyerschen Reagens untersucht und bei denen er positives Resultat erzielt hat:

So ergab Gummiarabikum mit Zusatz von  $H_2O_2$  eine Rotfärbung, die ins Blaue überging; ohne Wasserstoffsperoxyd verlief die Reaktion negativ; ferner zeigten ungekochte Kartoffeln bei Zusatz von  $H_2O_2$  und Reagens eine Verfärbung, die als positiv bezeichnet werden mußte, wenngleich hier der Farbton mehr bläulich als rot war. Gekochte Kartoffeln reagierten negativ.

Fruchtsäfte, von denen mehrere untersucht wurden, zeigten einen positiven Ausfall der Reaktion nach Zusatz von Wasserstoffsperoxyd und Reagens. Wurde Wasserstoffsperoxyd fortgelassen, so blieb die Reaktion aus.

Überblicken wir das Ergebnis unserer Untersuchung, so ergibt sich folgendes:

1. Das Rhodamin steht sowohl der chemischen Formel nach als auch in seinen Reaktionen dem Phenolphthalein nahe;
2. das Fuldsche Reagens zeigt bei Anwesenheit von Blut eine rote Reaktion, die bei größeren Verdünnungen mehr blaurot ist;
3. das Reagens besitzt eine große Empfindlichkeit gegen Blut; für gerichtliche Zwecke liegt die Grenze bei 1 : 100 000;
4. die Reaktion verläuft etwa der Menge des vorhandenen Blutes parallel;
5. das Fuldsche Reagens gibt keine spezifische Reaktion.

#### Literatur.

Adler, O. und R., Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. 1904, S. 59. — Asanelli, Tribune Médical 1907, Nr. 42, S. 1744; Il Paliclinica 1907, Nr. 24. — Batelli, Recherches sur les fonctions de la Catalase. Cpt. rend. des séances de la soc. de biol. 1910, S. 813. — Beilstein, Handbuch der organischen Chemie 1904. — Benoit, Contribution à l'étude du réactif phénolphtalique de Kastle-Meyer. Lille 1911. — Boas, Zentralbl. f. inn. Med. 1906. — Diels, Einführung in die

organische Chemie 1919. — Fleig, Soc. de biol. 1910. — Florence, Determiation des taches de sang critiques. Arch. d'anthropol. crim. de méd. legale 25. Jahrg., Nr. 203. Lyon 1910. — Fränkel, Praktikum der medizinischen Chemie für Mediziner und Chemiker, einschl. der forensischen Nachweise für Mediziner und Chemiker 18. — Fuld, E., Biochem. Zeitschr. 79, 241, 248, 254. — Ganassini-Bellusi (Rom), Arch. di antropol. crim. psichiatr. e med. 1913, Heft 3. — Gerlach, Die Untersuchung von Blutspuren mit der Wasserstoffsperoxydprobe und der von Florence angegebenen Modifikation der Guajak-Terpentinprobe. Ärztl. Sachverst.-Zeit. 1911, Nr. 13. — von Georgievics, Lehrbuch der Farbchemie S. 163. — Herzog, O. R., in Oppenheimer, Die Fermente und ihre Wirkung. 4. Aufl. 1913. — Höber, R., Physikal. Chemie der Zelle und der Gewebe 1914. — Kastle, I. et O. Schedd, 1. Phenolphthalin as a reagent for the oxidizing ferments. Americ. chem. journ. Baltimore 1901, S. 526—539. 2. Journ. biol. chem. Proceedings, tome III, S. 12. 1907. — Koitcheff, Les Reactions colorées du sang. Leur valeur le gale 1912. — Kratter, Bemerkungen über den Wert der Guajak-Reaktion für den forensischen Blutnachweis. Vierteljahrsschr. f. gerichtl. Med. u. öff. Sanitätsw. 1910, 3 F, IX Bd., Suppl.-Heft. — Leers, Die forensische Blutuntersuchung. Berlin 1910. — Lochte, Handbuch der gerichtsarztlichen und polizeiärztlichen Technik 1914. — Lochte und Fiedler, Das Leukomalachitgrün als Reagens auf Blutfarbstoff. Ärztl. Sachverst.-Zeit. 1913, Nr. 21. — Merkel, Die praktische Verwertung der Benzidinprobe für die forensische Blutdiagnose. Münch. med. Wochenschr. 56. Jahrg., Nr. 46. 1909. — Meyer, Münch. med. Wochenschr. 50, 1492. 1903. — Michel, Über den forensisch-chemischen Blutnachweis mittels der Leukomalachitgrünbase. Chem. Zeit. 1911, Nr. 43, S. 389; Ref. Chem. Zentralbl. 1, 1559. 1911. — Ostwald, W., Über Katalyse. Vortrag a. d. Vers. d. Ges. dtsh. Naturforsch. u. Ärzte 1901. — Raudnitz, W., Zentralbl. f. Physiol. 7. 1908. — Rossel, Schweiz. Wochenschr. f. Chem. u. Pharmakol. 39, 557. 1901. — Schade, Die Bedeutung der Katalyse für die Medizin. Kiel 1907. — Schaer, Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. 1900, S. 42. — Schönbein, Über das Verhalten des Blutes zum Sauerstoff. Journ. f. prakt. Chem. 89, 22. 1863. — Schumm und Westphal, Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. 1905, S. 510. — Woker, G., Die Katalyse, Bd. 11 und 12 der Sammlung von Margosches, Die chem. Analyse.

---