

Eine neue mikrochemische Methode zur Identifizierung von Sperma¹.

Von

U. H. Puranen, Helsinki (Finnland).

Mit 15 Textabbildungen.

Bis jetzt hat man keine solche chemische Reaktion erfunden, die das Suchen nach Spermatozoen wesentlich erleichtern würde, und noch weniger eine solche Reaktion, die in den azoospermischen Fällen und auch sonst, beim Mißlingen des Nachweises von Spermatozoen, zur Identifizierung menschlicher Samenflüssigkeit, besonders in Flecken, die mit dieser Flüssigkeit beschmutzt sind, für sich allein ausreichen würde. Immer hat man diesen Mangel erkannt, aber jetzt, wenn die Vasektomie im Dienste der Massensterilisierung neue Azoospermiker offiziell, besonders unter den Verbrechern schafft, hat man ein dringendes Bedürfnis für eine solche Reaktion.

Im folgenden möchte ich eine derartige Reaktion darlegen.

Unter Beobachtung der Vor- und Nachteile der *Barberioschen* Spermareaktion² habe ich folgende vergleichende Versuche mit Pikrinsäure (*Barberiosches* Reagens) und einigen *Nitrofarbstoffen*³ gemacht. Dabei wurden sowohl Reagens als Sperma in Wasserlösung angewandt. Die in der Reaktion entstandenen Krystalle werden in Mikrobildern unter 350maliger Vergrößerung dargestellt (Tab. 1).

Tabelle 1.

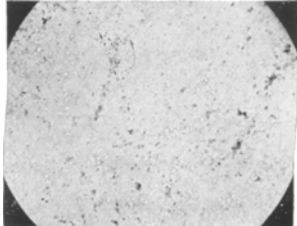
Die untersuchte Nitroverbindung	Formel	Die Krystallreaktion
Pikrinsäure (<i>Barberiosches</i> Reagens) Mol. Gew.: 229,05	$ \begin{array}{c} \text{OH} \\ \\ \text{O}_2\text{N} - \text{C}_6\text{H}_2 - \text{NO}_2 \\ \\ \text{NO}_2 \end{array} $	

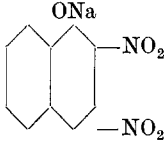
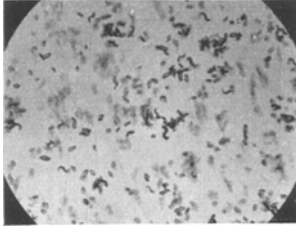
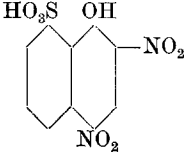
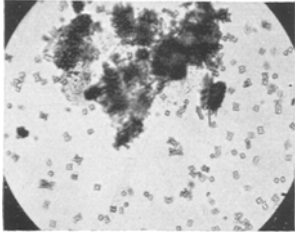
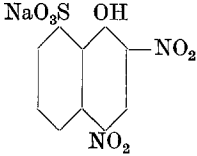
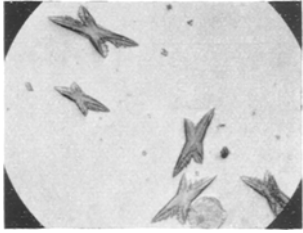
Abb. 1.

¹ Die diesbezügliche vorläufige Mitteilung ist in Suomen Kemistilehti 8, B, 7 (1935) (Eingegangen am 8. II. 1935) und als Referat in Chem. Zbl. 1935 II, 728, erschienen.

² P. Fränckel u. R. Müller, Dtsch. med. Wschr. 1908, Nr 16; M. Barberio, Dtsch. med. Wschr. 1911, Nr 5, 214.

³ Von den angewendeten Farbstoffen — alle Erzeugnisse der I. G. Farbenindustrie Aktiengesellschaft — war Naphtholgelb S hier käuflich, aber die Farbsäuren hatte das Laboratorium der I. G. Farbenindustrie in zuvorkommender Weise mir zur Verfügung gestellt, wofür ich hiermit bestens danke.

Tabelle 1 (Fortsetzung).

Die untersuchte Nitroverbindung	Formel	Die Krystallreaktion
Natriumsalz von 2,4-Dinitro- α -Naphthol; Martiusgelb		 <p data-bbox="847 534 907 558">Abb. 2.</p>
2,4-Dinitro- α -Naphthol-Sulfonsäure (7); freie Farbsäure von Naphtholgelb S Mol. Gew.: 314,124		 <p data-bbox="847 829 907 854">Abb. 3.</p>
Natriumsalz von 2,4-Dinitro- α -Naphthol-Sulfonsäure (7); Naphtholgelb S		 <p data-bbox="847 1124 907 1149">Abb. 4.</p>
2,4-Dinitro- α -Naphthol (Freie Farbsäure von Martiusgelb) Mol. Gew.: 234,06		Keine Krystalle

Wie ersichtlich, entstehen aus Sperma bei neutraler oder schwach alkalischer Reaktion mit einer wässrigen Lösung von *Naphtholgelb S* (Dinitronaphtholsulfonsaurem Natrium, Flaviansaurem Natrium) charakteristisch geformte, große Krystalle. Die kleineren von diesen Krystallen haben an den entgegengesetzten Enden charakteristische Einkerbungen (Abb. 5).

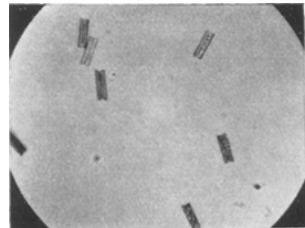


Abb. 5.

Die größeren dieser Krystalle stellen prächtige schiefe Kreuze dar, deren Länge oft 0,1 mm erreicht, und deren spitze Winkel gewöhnlich 35—45° beträgt (Abb. 6).

Die Krystalle sind stark doppelbrechend (Abb. 7).

Wie die Flavianate überhaupt, sehen auch diese aus Sperma entstandenen Flavianatkrystalle¹ unter dem Mikroskop gelb aus, sind aber orangefarbig, wenn sie isoliert in reinem Zustande in größeren Aggre-

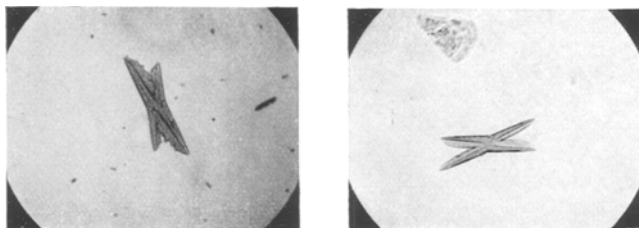


Abb. 6.

gaten vorliegen. Brechungsindices sind 1,56 und $> 1,74$. Die Auslöschungsrichtungen fallen zusammen mit den Halbierungslinien der Winkel.

Das Spermaflavianat ist praktisch unlöslich in Wasser. Bei 19,5° ist die Löslichkeit nur 0,00028 g in 100 cem Wasser oder 1 Teil: 357 000



Abb. 7.

Teile. (Vgl. die Löslichkeit des Bariumsulfats in Wasser 1:400 000). Die Fällungsreaktion ist also *quantitativ*, und, da keine Eiweißfällung die Reaktion kompliziert, kann man die reagierende Verbindung aus Sperma leicht ausscheiden und auch quantitativ bestimmen, nachdem die Zusammensetzung des Flavianats erforscht worden ist. Der quantitative Verlauf der Reaktion ist hier beinahe gleichbedeutend mit der *idealen Empfindlichkeit* derselben. Mit 1 cem einer Lösung von Sperma im Wasser im Verhältnis 1:1000 gelingt die Reaktion noch gut, und doch, wie man im folgenden erfahren wird, ist der Gehalt der reagierenden Substanz an Sperma nur etwa 0,1%. Bezüglich dieser Substanz

¹ Die Verbindung wird weiter gekürzt Spermaflavianat geschrieben.

ist die Erfassungsgrenze der Reaktion ein Millionstel Gramm ($1\mu\text{g}$ oder 1γ).

Außer im kalten Wasser, ist das Spermaflavianat auch im kochenden Wasser und desgleichen in anderen unorganischen und organischen Lösungsmitteln unlöslich, die starken Säuren jedoch ausgenommen. Die Krystalle schmelzen nicht ohne Zersetzung, was bei 240° geschieht.

Die reagierende Substanz von Sperma ist nicht flüchtig und verändert sich mit der Zeit auch nicht zu leicht. Auch die Sperma-Wasser-Verdünnungen behalten ihre Reaktionsfähigkeit mehrere Monate lang, wenn man sie im Kühlschrank bei $+4^\circ$ aufbewahrt. Auch die mit Spermaflecken betüpfelten Filtrierpapiere und Lappen ließen sich in trockenem Zustande frei an der Luft im Laboratorium aufbewahren, und doch gelang die typische Reaktion noch nach 10monatiger Aufbewahrung gut.

Das Substrat der Spermaflecken hat eine beachtenswerte Wirkung auf das Gelingen und die Ausführung der Reaktion. Verschiedenartige Kleidungsstoffe und andere Substrate, die in der Tab. 2 verzeichnet sind, wurden mit $0,02\text{ g}$ Sperma befleckt. Von jedem Substrat wurden je zwei Flecken ausgeschnitten und im ersten Falle mit $5,0\text{ ccm}$ und im zweiten Falle mit $0,5\text{ ccm}$ physiologischer Kochsalzlösung, aber in beiden Fällen 18 Stunden lang ausgelaugt, die Lösungen mit 2 bzw. 1 Tropfen der Reagens versetzt und dann 4 Stunden sich selbst überlassen. Die überstehende klare Flüssigkeit wurde dann vorsichtig dekantiert oder mittels eines capillaren Hebers abgezogen. Der auf dem Boden zurückgebliebene Tropfen wurde durchgeschüttelt, dann auf ein Objektglas fallen gelassen und mit einem Deckglas überdeckt mikroskopiert. Das Auftreten der typischen Krystalle wird in der Tab. 2 mit +, das Ausbleiben derselben mit — bezeichnet.

Aus den erzielten Ergebnissen ersieht man, daß die reagierende Substanz des Sperma von dem Substrate adsorbiert wird, und zwar in solchem Maße, daß der übrigbleibende Anteil der Substanz nicht mehr verdünnt werden darf. Im Gegenteil soll auch die Sorption selbst mit allen Mitteln bekämpft werden. Von solchen Mitteln steht eigentlich nur ein einziges zur Verfügung: Die Reduktion des Verhältnisses $\frac{\text{Substrat } g}{\text{Sperma } g}$ bis auf ein Minimum, d. h. nicht beschmutzte Stellen dürfen niemals mitgenommen werden, und sogar, nötigenfalls, müssen nur die am meisten beschmutzten Fasern — gewöhnlich nur die aus den Flecken herausragenden Faserenden — ausgewählt werden und der Versuch mit diesen in Capillarröhrchen oder direkt unter dem Deckglase ausgeführt werden. Die letzte Kolumne der folgenden Tab. 2 zeigt, daß in dieser Versuchsserie eine solche Auswahl auch in den schlimmsten Fällen der Sorption Abhilfe geschaffen hat. Da man von

Tabelle 2.

Substrate	Ergebnisse der Reaktion		
	mit 5,0 ccm	mit 0,5 ccm	mit Auswahl
Filtrierpapier	+	+	.
Zeitungspapier	—	+	.
Toilettenpapier	—	+	.
Schreibpapier	—	kein Versuch	.
Postkartenkarton	—	—	kein Versuch
Triko, gefärbt, Kunstseide	+	+	.
Wollener Stoff, gefärbt	—	+	.
Crêpe du Chine	—	—	+
Halbseidener Stoff 1	+	+	.
„ „ 2	+	+	.
„ „ 3	+	+	.
„ „ 4	+	+	.
„ „ 5	+	+	.
„ „ 6, gefärbt	+	+	.
Leinwand 1, gefärbt	—	—	+
„ 2, ungefärbt	+	+	.
„ 3, „	+	+	.
Flanell, gefärbt	+	+	.
Nansook (Nainsuch)	+	+	.
Baumwollener Trikot	+	+	.
Sackstoff	+	+	.
Grober Hanfstoff	—	—	+
Kunstseidener Stoff 1, gefärbt	—	—	+
„ „ 2, „	—	—	+
„ „ 3, „	—	—	+
Gaze	+	+	.
Binde	+	+	.
Grober Wollentstoff, naturschwarz	+	kein Versuch	.
Cheviot	—	„	kein Versuch

der Sorption eines zu untersuchenden unbekanntes Stoffes keine Ahnung hat, muß man entweder mit dem letztgenannten Kunstgriffe beginnen oder sich von der Ungefährlichkeit der Sorption, durch einen Kontrollversuch, überzeugen.

Eine mechanische Auswahl kommt kaum in Frage, wenn ein in losem Zusammenhange auftretendes Substrat z. B. in Pulverform zur

Tabelle 3.

Substrate	Ergebnisse	Substrate	Ergebnisse
Baumwolle	+	Bolus alba	—
Gebleichte Sulfitzellulose	+	BaSO ₄ (Blanc fixe)	—
Wolle und Haare	+	Titanweiß	—
Bimstein	—	Torfstreu	—
Kohle	—	Sägemehl	—
Fe ₂ O ₃	—		

Spermauntersuchung gelangt. Glücklicherweise hat ein solcher Fall fast nur eine theoretische Bedeutung (Tab. 3).

Das Sorptionsvermögen der porösen und pulverförmigen Substanzen ist eine bekannte Tatsache. Aus derartigen Substraten können analytisch nachweisbare Mengen der reagierenden Verbindung des Spermas mit Wasser oder physiologischer Kochsalzlösung nicht ausgelaugt werden.

Um die Spezifität der neuen Flavianatreaktion zu erforschen, habe ich zunächst folgende Ausscheidungen des gesunden menschlichen Körpers qualitativ untersucht. Gleichzeitig habe ich mich durch Kontrollversuche davon überzeugt, daß solche Ausscheidungen die Reaktion des Spermas mit Naphtholgelb S nicht verhindern (Tab. 4).

Tabelle 4.

Ausscheidungen	Resultat der Reaktion	
		Beim Kontrollversuch nach einem Zusatz von 0,02 g Sperma
Harn (eines Mannes)	—	+
Harn während Käse-Diät.	—	Kein Versuch
Fäzes (eines Mannes)	—	„
Fäzes während Käse-Diät	—	„
Speichel (eines Mannes)	—	+
Sputum (eines Mannes)	—	+
Nasenschleim (eines Mannes)	—	+
Schweiß	—	+
Menstrualblut	—	+
Schleim aus der Vagina	—	+

Weiter habe ich folgende in den hiesigen Universitätskliniken bezogene und als Flecke auf Gaze und Binden mir übersandte Proben qualitativ untersucht (Tab. 5).

Diese Versuche haben gezeigt, daß die normalen und die gewöhnlichen pathologischen Ausscheidungen des menschlichen Körpers, in so kleinen Mengen, wie sie in Flecken vorkommen, 1. die neue Flavianatreaktion nicht geben und 2. dieselbe nicht verhindern.

Aller Vermutung nach dürfte die reagierende Verbindung Spermas eine organische Base sein. Daher habe ich auch die folgende definierte und auch die in einigen Mischungen enthaltene Base qualitativ untersucht und bin davon überzeugt, daß aus keiner der untersuchten Basen mit Flaviansäure optisch ähnliche Krystalle wie die aus der Samenflüssigkeit entstehen. Bei diesen Versuchen ist die Fällung bei neutraler oder schwach alkalischer Reaktion ausgeführt worden.

1. Alle nicht seltenen unorganischen Basen; auch Hydrazin und Hydroxylamin.

Tabelle 5.

Nr.		Ergebnisse der neuen Reaktion	Kontrollversuch mit 0,02 g Sperma
1.	17. I. 1935 H. T., 27 Jahre alte Tochter eines Ackerbauers	—	.
2.	18. I. Diagn.: Lupus erythematodes acutus	—	.
3.	24. I.	—	.
4.	26. I. (Proben aus der Scheide) . . .	—	.
5.	30. I.	—	.
6.	16. I. 1935 A. H., 24 J., Dienerin	—	.
7.	18. I. Diagn.: Ulcus chronicum vulvae	—	.
8.	19. I. (Proben aus der Scheide) . . .	—	.
9.	16. I. 1935	—	.
10.	17. I. K.. la	—	.
11.	19. I. Diagn. —	—	.
12.	20. I. (Proben aus der Scheide) . . .	—	.
13.	17. I. 1935 E..nen	—	.
14.	24. I. Diagn. —	—	.
15.	29. I. (Proben aus der Scheide) . . .	—	.
16.	16. I. 1935 N. V., 21 J., Dienerin	—	.
17.	17. I. Diagn.: Lues seropositiva . . .	—	.
18.	18. I. (Proben aus der Scheide) . . .	—	.
19.	20. II. 1935 Schleim von den Genitalien einer Gebälerin	—	+
20.	20. II. 1935 Kinderwasser, kurz nach der Geburt	—	+
21.	20. II. 1935 Blut von der Oberfläche der Nachgeburt	—	+
22.	20. II. 1935 Probe aus der Scheide, 45 J., Diagn.: Cervicitis chr. Myoma uteri	—	+
23.	20. II. 1935 Probe aus der Scheide, 27 J., Diagn.: S-O: itis bilat. levis? .	—	+
24.	20. II. 1935 Probe aus der Scheide, 43 J., Diagn.: S-O: itis bilat. chron. Parametritis post. et dx. (Carc. corp. ut. ??)	—	+
25.	20. II. 1935 Probe aus der Scheide, 24 J., Diagn.: S-O: itis bil. chron. (gonorrh.?)	—	+
26.	20. II. 1935 Probe aus der Scheide, 34 J., Diagn.: S-O: itis chron. levis; cysta (rentent?) ovarii sin . .	—	+

2. Mono-, Di- und Trimethylamin; Äthylendiamin, Tetra- und Pentamethylendiamin; Glykokoll, Alanin, Asparagin, Cholin, Kreatin, Kreatinin, Glykosamin, Guanidin, Histamin, Tyramin, Betain, Lysidin, Piperidin, Piperazin, Anilin, Chinolin, Nicotin, Narcotin, Strychnin, Brucin.

3. Testes bovi siccati; Saft aus den frischen Testes des Stieres, des Ebers und des Widders; Hydrolysat aus den genannten Testes; Fleischbrühe (Bouillon); faules Rinderfleisch; Kuhmilch und Frauenmilch; Mutterkornextrakt; Fischsperma (Quappe).

Nach den Literaturangaben¹ gibt es in der Samenflüssigkeit zwei organische Basen, deren Konstitution erforscht und sogar durch Synthesen bewiesen ist:

1. Spermin, $C_{10}H_{26}N_4$, $H_2N-(CH_2)_3-NH-(CH_2)_4-NH-(CH_2)_3-NH_2$
2. Spermidin, $C_7H_{19}N_3$, $H_2N-(CH_2)_3-NH-(CH_2)_4-NH_2$

Außer den obenerwähnten Basen soll die Samenflüssigkeit noch basische Eiweißstoffe, Protamine, enthalten.

Um die Identität der in Spermaflavianat enthaltenen Verbindung mit diesen Basen zu prüfen, wurde zuerst die neue Flavianat in größeren Mengen aus dem Sperma ausgeschieden.

1. 5,7 g frisches Sperma wurde mit 50 ccm physiolog. NaCl-Ig gemischt und mittels Zentrifugierung und Waschen von Spermatozoen und anderen unlöslichen Partikeln befreit; das klare, nur wenig opaleszierende Zentrifugat wurde mit dest. H_2O zu 250 ccm verdünnt und in einem Sedimentierungszylinder mit etwa 10 ccm des Reagens — 4—5 g Naphtholgelb S in 100 ccm Wasser gelöst und filtriert — gemischt; die Lösung wurde über Nacht im Kühlschrank (+ 4°) stehen gelassen, dann dekantiert und der auf dem Boden befindliche Niederschlag durch mehrmaliges Zentrifugieren und Waschen mit dest. Wasser bis bald auf völlige Farblosigkeit des Waschwassers gereinigt und im Vakuum-exsiccator über konz. Schwefelsäure getrocknet. Alle diese Operationen wurden ohne Verlust des Niederschlages ausgeführt. Das erhaltene Flavianat wog 0,0300 g.

Elementaranalyse durch Mikroverbrennung dieser Substanz wurde von *A. Schoeller* in Berlin mit folgenden Ergebnissen ausgeführt:

4,479 mg:7,010 mg CO_2 ; 1,870 mg H_2O ; 0,024 Rest.
 2,741 „ :0,294 ccm N 24,5° 760 mm.
 13,888 „ :6,950 mg $BaSO_4$.

¹ *M. C. Rosenheim*, J. of Physiol. (Proc.) **51**, VI, VII (1917); *H. W. Dudley* and *O. Rosenheim*, Biochemic. J. **19**, 1032 (1925); **19**, 1034 (1925); *F. Wrede* u. *E. Banik*, Hoppe-Seylers Z. **131**, 29 (1923); *F. Wrede*, *H. Fanselow* u. *E. Strack*, Hoppe-Seylers Z. **161**, 66 (1926); **163**, 219 (1927); *H. W. Dudley*, *O. Rosenheim* and *W. W. Starling*, Biochemic. J. **20**, 1082 (1926); **21**, 97 (1927).

Berechnete Prozentgehalte sind in der Tab. 6 Seite 375 ersichtlich.

2. Zum zweiten Male wurde Sperma mit einer 5fachen Menge physiologischer Kochsalzlösung gemischt und im Ultrafiltrierapparat nach Prof. *Giemsa* filtriert. In dem wasserklaren Filtrat, mit der Lösung der Naphtholgelb S zusammengebracht, entstanden die charakteristischen Krystalle (Abb. 8).

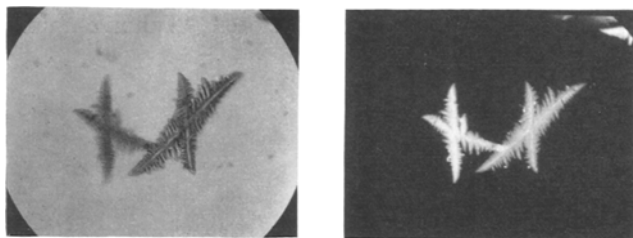


Abb. 8.

Die Mikroverbrennungsergebnisse von dem in dieser Art erhaltenen Flavianat waren folgende:

4,824 mg:7,530 mg CO₂; 1,950 mg H₂O; 0,030 mg Rest.
 3,075 „ :0,340 ccm N 25° 763 mm.
 11,565 „ :6,255 mg BaSO₄.

Die berechneten Werte werden in der Tab. 6, Seite 375 prozentual angegeben.

3. Zum dritten Male wurde in gleicher Weise wie unter 1. verfahren, nur mit der Ausnahme, daß statt des Naphtholgelb S das Natriumsalz

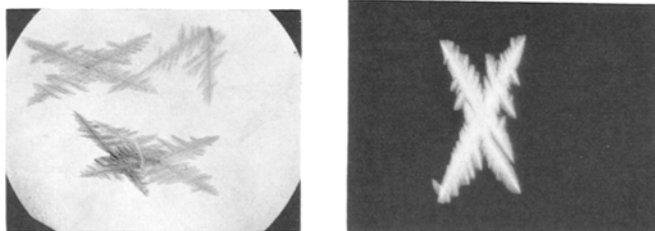


Abb. 9.

der reinen, 3 mal aus konz. HCl umkrystallisierten Flaviansäure, Sp. 141°, angewandt wurde.

Resultate der Mikroverbrennung:

4,854 mg:7,625 mg CO₂; 2,140 mg H₂O; 0,015 mg Rest.
 2,904 „ :0,332 ccm N 25° 754 mm.
 9,589 „ :4,615 mg BaSO₄.

Als Prozente sind diese Werte in der Tab. 6 Seite 375 umgerechnet.

4. In derselben Tabelle sind außerdem die Prozentwerte, die bei der Mikroverbrennung des aus synthetischem Sperminum phosphoricum Schuchardts und flaviansaurem Natrium entstandenen, unlöslichen Flavianates (Abb. 9) erhalten wurden, zum Vergleich angeführt worden.

Resultate der Mikroverbrennung:

4,525 mg:7,135 mg CO₂; 1,880 mg H₂O; 0,017 g Rest.
 3,281 „ :0,363 ccm N 25° 754 mm .
 13,281 „ :7,325 mg BaSO₄ .

Tabelle 6.

	Aus Mikrobestimmungen erhaltene Prozentwerte					Berechnete Prozentwerte	
	I	II	III	IV	V	Für Spermin- di- flavianat	Für Spermin- mono- flavianat
	Aus dem Zentrifugat von Sperma mit Naphtholgelb S	Aus dem Giemsa-Filtrat von Sperma	Aus Sperma mit rein. Na-Salz d. Flaviansäure	Aus synth. Sperminum phosph.	Aus 0,03 g Spermin + 0,005 g Spermidin		
C	42,69	42,57	42,84	43,00	42,37	43,35	46,48
H	4,67	4,52	4,93	4,65	4,73	4,61	6,23
N	12,31	12,71	12,99	12,57	12,53	13,49	10,85
S	6,87	6,85	6,61	7,58	7,62	7,72	6,21
Rest.	0,5	0,62	0,31	0,38	0,45	—	—

5. Ebenso sind die Prozentwerte, die entsprechend aus einer Mischung von 0,36 g Sperminum phosphoricum (synth.) und 0,005 g Spermidinum phosphoricum (synth.) erhalten wurden, in der Tab. 6 Seite 375 ersichtlich.

Resultate der Mikroverbrennung:

4,618 mg:7,175 mg CO₂; 1,950 mg H₂O;
 0,021 mg Rest.
 3,111 „ :0,342 ccm N 24° 754 mm .
 14,911 „ :8,270 mg BaSO₄ .

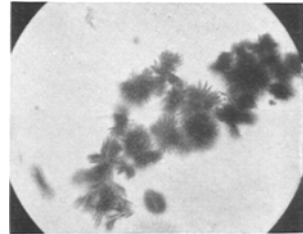


Abb. 10.

Die Löslichkeit des Spermidinflavianats ist bedeutend größer als des Sperminflavianats, und zwar ist sie bei 18° :0,0439 g/100 ccm Wasser. Die Krystalle jenes sind kleine Nadelchen in sphärischen Aggregaten gruppiert (Abb. 10).

Das Spermidinflavianat wurde aus Wasser 3mal umkrystallisiert und im Vakuumexsiccator über konz. H₂SO₄ Schwefelsäure getrocknet.

Resultate der Mikroverbrennung:

I 4,653 mg:6,990 mg CO₂; 2,030 mg H₂O — Rest.
 II 4,531 „ :6,805 „ CO₂; 1,950 „ H₂O — „
 I 2,657 mg:0,294 ccm N; 23° 754 mm .
 II 2,514 „ :0,285 „ N; 22,5° 754 mm .
 I 10,470 mg:5,540 mg BaSO₄ .
 II 10,645 „ :5,805 „ BaSO₄ .

Entsprechende Werte prozentual angegeben:

Tabelle 7.

	Aus Mikrobestimmungen erhaltene Prozentwerte		Berechnete Prozentwerte	
	I	II	für Spermidindiflavianat	für Spermidinmonoflavianat
C	40,97	40,96	41,89	44,41
H	4,88	4,82	4,04	5,49
N	12,66	12,99	12,68	15,25
S	7,27	7,49	8,29	6,98
Rest	—	—	—	—

Auf Grund der erzielten Ergebnisse kann man darauf schließen, daß die reagierende Base des Sperma Spermin ist. Dies wurde auch direkt

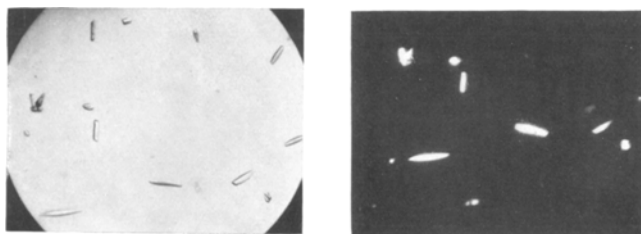


Abb. 11.

bewiesen. Als das nach *Giemsa* erhaltene Spermafiltrat im Vakuum verdunstet wurde, ließen sich daraus spontan wasserhelle Krystalle entstehen (Abb. 11).

Diese Krystalle, die ohne Zweifel bekannte Spermakrystalle oder *Böttchersche* Krystalle waren und aus phosphorsaurem Spermin be-

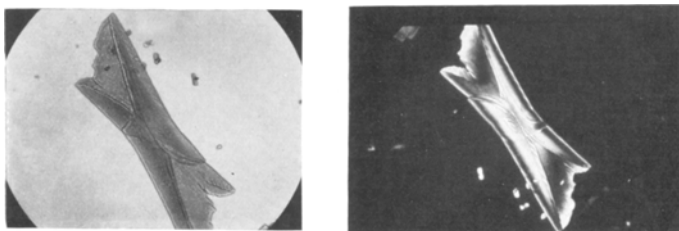


Abb. 12.

standen, wurden aus heißem Wasser umkrystallisiert und in wässriger Lösung mit unserem Reagens, Naphtholgelb S, zusammengebracht. Resultat: typische Krystalle, und zwar denen direkt aus Samenflüssigkeit erhaltenen ähnlich (Abb. 12).

Das neue Flavianat, was ich hiermit zur Erkennung der Samenflüssigkeit vorschlagen möchte, ist also ein Salz der Sperminbase, $C_{10}H_{26}N_4$ und der Flaviansäure, $C_{10}H_4(OH)(NO_2)_2SO_3H$. Aus den erhaltenen Verbrennungsergebnissen geht es hervor, daß das Sperminflavianat pro 1 Mol Base 2 Mol Säure enthält, als MolGew. 830,488 und eine empirische Zusammensetzung $C_{20}H_{38}N_8O_{16}S_2$ besitzt.

Nunmehr kann die Reaktion auch zur quantitativen Bestimmung der Sperminbase angewandt werden. Oben, S. 373, wurde die in der untersuchten Spermaprobe, deren Menge sich auf 5,7 g belief, enthaltene Sperminbase als Flavianat quantitativ ausgeschieden, und zu 0,03 g gewogen. Der Spermingehalt kann daraus errechnet werden. Die untersuchte Spermaprobe enthielt 0,13% Spermin.

Die Samenflüssigkeit verdankt ihren Spermingehalt der Aktivität der Vorsteherdrüse, Prostata. Solange diese Aktivität erhalten bleibt, solange gelingt auch der Nachweis der Samenflüssigkeit mit der neuen

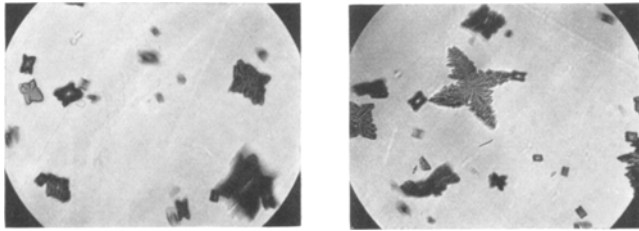


Abb. 13.

Flavianatreaktion. Azoospermie — natürliche oder künstliche — geht durchaus nicht parallel mit der Vernichtung der Aktivität von Prostata. Dies ist auch aus folgenden Abbildungen ersichtlich, die die aus Sperma eines Azoospermikers erhaltenen Sperminflavianatkrystalle darstellen (Abb. 13).

Nach den bisherigen Untersuchungen ist Spermin nicht nur in der Samenflüssigkeit und im Prostata enthalten. Wie die folgende Tab. 8 zeigt, ist das Spermin auch in anderen verschiedenen Menschen- und tierischen Organen und sogar außerhalb des Tierreiches in Hefe und — das möchte ich hinzufügen — im Käse, obgleich in verschwindend kleinen Quantitäten vorgefunden worden.

Der Unterschied zwischen der Samenflüssigkeit und den anderen oben erwähnten Proben, soweit es Spermin anbetrifft, sollte darnach quantitativer aber nicht qualitativer Natur sein. Verhält es sich aber tatsächlich so, daß die Menge des Spermins in allen als Flecke vorkommenden Quantitäten dieser Proben in Sperma innerhalb, in allen anderen außerhalb der analytischen Nachweisbarkeit liegt, so ent-

Tabelle 8.

Untersuchungsobjekte	Spermingehalt %	Forscher
Menschensperma, frisch	0,13—0,28	<i>O. Rosenheim</i>
Rinderhoden (testes bovi)	0,006	<i>Dudley, M. C., and O. Rosenheim</i>
Rinderovaria	0,014	Dieselben l. c.
Pankreas	0,025—0,03	„
Gehirn	0,007	„
Milz	0,011	„
Thymusdrüse	0,005	„
Thyroiddrüse	0,003	„
Hefe	0,01—0,04	„
Rinderblut	—	„
Blutserum	—	„
Kuhmilch	—	„
Stiersperma	—	„
Hühnerei	—	„
Menschliche Hoden	0,003 ¹	<i>Wrede l. c.</i>
Muskel	0,009	Derselbe
Gehirn	0,015	„
Milz	0,023	„
Leber	0,050	„
Pankreas	0,054	„
Menschliches Sperma	0,380	„
Rindermuskel	0,010	„
Rinderprostata	0,014	„
Rinderblut	Spuren	„
Rinderhoden	0,013	„
Rinderpankreas (weibliche Tiere)	0,087	„

scheidet schon die qualitative Probe, ob der zu untersuchende Fleck Samenflüssigkeit enthält oder nicht. Außerdem scheint die Spermin-

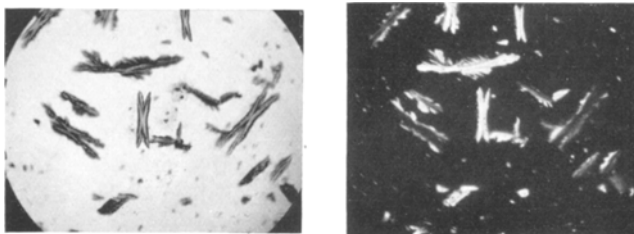


Abb. 14.

base nur in der Samenflüssigkeit in solcher Form vorzukommen, daß sie daraus mit Wasser oder physiologischer Kochsalzlösung ausgelaugt werden kann, aus allen anderen Organen usw. aber nicht, nicht einmal

¹ *Wrede* gibt (l. c.) diese Zahlen als Promille (!) an.

aus großen Quantitäten solcher. Ich habe z. B. feststellen können, daß aus Hefe, von einigen 100 g ausgegangen, diese mit konz. HCl hydrolysiert, nach mühsamen Operationen nur wenige Krystalle folgender Form erhalten werden (Abb. 14).

Niemals habe ich solche Krystalle aus Hefe erhalten können, wenn diese mit physiologischer Kochsalzlösung frisch oder nach Tötung durch Hitze oder nach Verwesung der Zellen ausgelaugt wurde. Ich habe auch einmal aus Emmenthaler Käse mit ziemlich starker Essigsäure eine in dem Käse spurenweise enthaltene Base (Spermin?) extrahiert, die mit Naphtholgelb S die typischen Krystalle des Sperminflavianats auf-

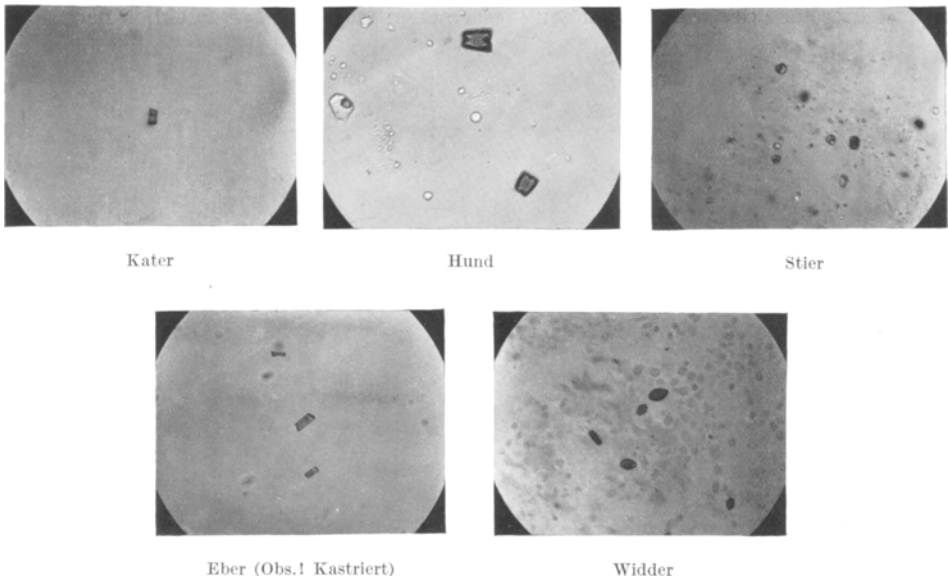


Abb. 15.

wiesen, im Wasser oder in physiologischer Kochsalzlösung löst sich jedoch von dem Käse als solchem oder nach Extraktion des Fettes keine solche Base auf.

Nur im tierischen Sperma befinden sich wahrscheinlich basische Verbindungen, die in wasserlöslicher Form frei vorliegen. Bisher habe ich keine Gelegenheit gehabt, wahre Proben tierischer Spermien zu untersuchen, jedoch wurden die Prostatastrüsen folgender Haustiere in physiologischer Kochsalzlösung maceriert und weiter mittels der neuen Reaktion untersucht (Abb. 15).

Wie ersichtlich, gibt es auch in den Prostatastrüsen dieser Tiere, wenn auch nur Spuren, basischer Verbindungen, die schwerlösliche Flavianate bilden und als — wenigstens ex analogia — Verwandte des

menschlichen Spermiums auftreten. Eine Unsicherheit für die praktische Spermauntersuchung nach der neuen Methode könnten sie kaum bedeuten.

Aber es ist von Bedeutung, daß nunmehr, da eine praktische chemische Methode zur Identifizierung Spermiums zur Verfügung steht, und da nicht mehr in der verzweifelten Jagd nach Spermatozoen das ganze Untersuchungsmaterial verbraucht werden muß, auch die serologischen art- und gruppenspezifischen Eigenschaften der Samenflüssigkeit ausgenutzt werden können und sollen.

In der Hoffnung, in der demnächst erscheinenden Monographie, für welche der weitere Ausbau dieser neuen Methode, ausdrücklich nach deren quantitativer Seite hin hiermit vorbehalten wird, die Sache vollständiger darstellen zu können, beende ich diese Darlegung, aber zur evtl. Anwendung meiner Reaktion möchte ich noch folgende detaillierte Vorschrift für das Untersuchen von Flecken geben:

Reagens: 5 g Naphtholgelb S, dinitro-naphtholsulfons. *Na* — nicht K-Salz, welches zu schwerlöslich ist — wird in 100 ccm dest. H_2O gelöst und die Lösung filtriert.

1. Verdächtige Stellen werden mit Hilfe der Analysen-Quarzlampe entdeckt und gezeichnet.

2. Mit Hilfe einer Lupe und einer Pinzette werden die aus dem Fleck herausragenden Faserenden, welche Klümpchen von der beschmutzenden Substanz tragen, herausgefischt, in Capillarröhrchen oder unter Deckglas hineingesetzt und mit einem kleinen Tröpfchen physiologischer Kochsalzlösung 2 Stunden lang ausgelaugt. Dann wird ein Tröpfchen des Reagens hinzugesetzt und die evtl. Entstehung der Spermium-Flavianatkrystalle (vgl. Abb. 4—7, S. 367 u. 368) von Zeit zu Zeit während ein paar Stunden notiert.

3. Aus den verdächtigen Flecken werden je 1 qcm große Stückchen, wenn die Flecke so groß sind, anderenfalls weniger, und zwar immer nur die beschmutzten Stellen ausgeschnitten, die Stückchen je in ein serologisches Reagensglas, Durchmesser 7 mm, hineingesetzt und mit 0,5 ccm physiologischer Kochsalzlösung längere Zeit, lieber über Nacht bei Zimmertemperatur ausgelaugt. Dann werden die Stückchen herausgenommen und beiseite gelegt. Die Lösungen werden je mit einem Tröpfchen des Reagens gemischt. Nach 2—4stündigem Stehen werden die klaren Lösungen bis auf ein Tröpfchen vorsichtig dekantiert oder mittels eines capillaren Hebers abgezogen. Die auf dem Boden evtl. vorhandenen Krystalle werden in das zurückgebliebene Tröpfchen hineingeschüttelt, mit dem Tröpfchen auf ein Objektglas fallen gelassen, mit einem Deckglas überdeckt — (nicht drücken!) — und bei etwa 300maliger Vergrößerung untersucht.

Beim positiven Ausfalle der Flavianatreaktion sind die Spermatozoen nach den bekannten Methoden in den entsprechenden ausgelaugten Stückchen zu untersuchen.

Zusammenfassung.

1. Es wurde gezeigt, daß die in der Samenflüssigkeit enthaltene Sperminbase als Flavianat identifiziert, quantitativ ausgeschieden und quantitativ bestimmt werden kann.

2. Mittels dieser neuen Reaktion wurde die Tauglichkeit der Sperminbase zum Erkennungszeichen der menschlichen Samenflüssigkeit geprüft. Es wurde gefunden, daß die Flavianatreaktion, schon qualitativ ausgeführt, Auskunft darüber gibt, ob ein zu untersuchender Fleck Samenflüssigkeit enthält oder nicht.
