

(Aus dem Gerichtsärztlichen Institut der Universität Breslau.
Direktor: Prof. Dr. *Karl Reuter*.)

Untersuchungen über die Lichtabsorption des Blutes bei Blausäurevergiftung.

Von

Dr. med. habil. et jur. **Otto Schmidt**,
Dozent.

Mit 5 Textabbildungen.

Obleich die Körper der Cyanreihe sich im Reagensglase durch eine außerordentlich starke und vielseitige Wirkung auf den Blutfarbstoff und seine Derivate (Bildung von Cyanhämoglobin, Cyanhämatin und Cyanhämochromogen) auszeichnen, kommt es selbst bei tödlich endenden Fällen von Blausäurevergiftung nicht zu einer spektroskopisch sichtbaren Veränderung des Blutfarbstoffes. Man rechnet die Blausäure und ihre in HCN dissoziierbaren Salze nicht zu den eigentlichen Blutgiften. Die Blausäure wirkt in erster Linie auf die Funktion der Fermente ein, von denen insbesondere die Wirkung auf das Atmungsferment und das Cytochrom in letzter Zeit näher studiert worden ist. Die hellroten Totenflecke, die bei Cyanvergiftungen von einigen Autoren beschrieben worden sind, können durch die Behinderung der postmortalen Sauerstoffzehrung des Gewebes erklärt werden. Um eine spezifische Einwirkung des Cyans auf den Blutfarbstoff handelt es sich hierbei nicht. Das Leichenblut behält in solchen Fällen im wesentlichen den zur Zeit des Todes vorhandenen Sauerstoffgehalt bei. Eine Bindung des Cyans mit dem Blutfarbstoff oder seinen Derivaten im lebenden Organismus ist bisher nicht bewiesen worden. Geringe Abweichungen des Absorptionsspektrums hat *Vlès* bei cyanvergifteten Hunden feststellen können.

Welchen Veränderungen das Leichenblut bei Cyanvergiftungen überhaupt unterliegt, darüber liegen Untersuchungen bisher nicht vor. Die vorliegende Arbeit berichtet über das Auftreten von ihrer Natur nach bekannten und charakteristischen Cyanverbindungen des Blutfarbstoffs bei cyanvergifteten Tieren.

I. Die Bildung von Cyanhämoglobin.

Ein 19 kg schwerer Hund erhielt intrathorakal 10 ccm einer kalt gesättigten Cyankaliumlösung injiziert. Die anschließend vorgenommene Sektion ergab im Herzen flüssiges und locker geronnenes, teils hellrotes, teils dunkelrotes, nicht hämolytisches Blut. Bei spektro-

skopischer Untersuchung zeigte die wässrige Blutlösung das charakteristische Oxyhämoglobinspektrum. Die spektrographische Messung ergab das Spektrum des reinen Oxyhämoglobins, dessen logarithmische Extinktionswerte in Abb. 1, Nr. 1, wiedergegeben sind.

Es zeigte sich, daß das Tierblut nach längerem Stehen im Eisschrank einer langsamen Veränderung unterlag. Nach Verlauf einer Woche war eine allgemeine Hämolyse eingetreten. Bei spektroskopischer Untersuchung fanden sich 2 Absorptionsstreifen, die ihrer Lage nach dem Oxyhämoglobin entsprachen. Der zweite Schatten im Grün war jedoch breiter als es dem reinen Oxyhämoglobinspektrum entspricht. Beide Schatten waren in ihrer Intensität etwa gleich stark. Kräftiges Schütteln mit Luft veränderte die Lichtabsorption nicht.

Die spektrographische Untersuchung wurde bei möglichst kleinen Schichtdifferenzen nach *Scheibe* durchgeführt. Sie wurde mit Hilfe des Gitters unter Anwendung zweier senkrecht übereinanderstehender Balyrohre ausgeführt, von denen das eine die Blutlösung, das andere das jeweils entsprechende Lösungsmittel enthielt. Die logarithmischen Werte der gefundenen Extinktionen sind in Abb. 1, Nr. 2, wiedergegeben. Verglichen mit dem frisch entnommenen Blut zeigt sich eine recht deutliche Zunahme des zweiten Maximums, dessen höchster Punkt bei $541\text{ m}\mu$ liegt. Der erste Schatten ist schwächer geworden. Der Anstieg im Rot zeigt einen im ganzen flacheren Verlauf. Wertet man diese Kurve als Mischblut zwischen Oxyhämoglobin und Cyanhämoglobin, so ergibt sich ein Cyanhämoglobinanteil von 51,7%.

Die spektrographische Untersuchung des im Eisschrank aufbewahrten Blutes wurde nach 2 Monaten wiederholt. Die Extinktionskurve (Abb. 1, Nr. 3) zeigt den ersten Schatten nur noch als ein geringes Maximum bei $576\text{ m}\mu$. Das zweite Maximum hat an Intensität erheblich zugenommen. Es hat einen flachen, bogenförmigen Verlauf, dessen höchster Punkt bei $541\text{ m}\mu$ liegt. Der Anstieg im Rot ist noch flacher geworden. Der in der Lösung vorliegende Cyanhämoglobinanteil berechnet sich auf 84,2%.

Bei spektroskopischer Betrachtung erschien die Blutlösung noch deutlich zweistreifig. Das zweite Maximum im Grün war auffallend breit, asymmetrisch und kräftiger als der erste Schatten. Das Blut war nicht faul. Ein Geruch nach Blausäure lag nicht vor.

Vlès fand bei spektrophotometrischen Blutuntersuchungen blausäurevergifteter Hunde geringe Unterschiede im Extinktionsverhältnis bestimmter Wellenlängenbereiche, die mit diesen Messungen in Einklang stehen. In einer neutralen hämolysierten Blutlösung stellte er fest, daß das Verhältnis der Extinktionen von Maximum I zu Maximum II und das Verhältnis von $561\text{ m}\mu$ zu $500\text{ m}\mu$ abnimmt, während die Verhältnisse von $633\text{ m}\mu$ zu $541\text{ m}\mu$ und $561\text{ m}\mu$ zu $541\text{ m}\mu$ zunehmen.

Diese Untersuchungsbefunde, für die *Vlès* eine Erklärung nicht gibt, sind mit dem Auftreten von Cyanhämoglobin durchaus vereinbar.

Schneller als im Eisschrank geht die Umwandlung des Blutfarbstoffes in Cyanhämoglobin vor sich, wenn das Tierblut im Brutschrank bei Körpertemperatur aufbewahrt wird. Der Einfluß der Temperatur auf den Ablauf dieser Reaktion wird schon in der älteren Literatur, insbesondere von *Preyer*, der die Einwirkung des Cyans auf den Blutfarbstoff zuerst beschrieb, hervorgehoben. Bei Zimmertemperatur wurde aus dem untersuchten Tierblut bereits nach einigen Tagen ein Spektrum erhalten, dessen Extinktionsverlauf in Abb. 1, Nr. 4,

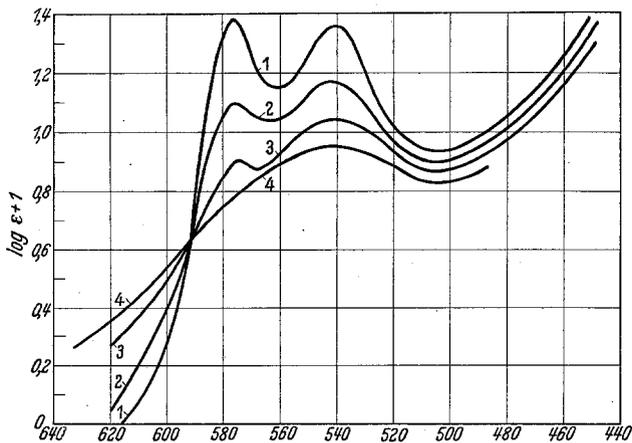


Abb. 1. Nr. 1: Blut eines cyanvergifteten Hundes in wässriger Lösung (Spektrum des reinen Oxyhämoglobins). — Nr. 2: Dasselbe Blut, aufgenommen nach 2 Wochen (Aufbewahrung im Eisschrank). (Mischblutspektrum aus Oxyhämoglobin und Cyanhämoglobin. Der Cyanhämoglobinanteil beträgt 51,7%.) — Nr. 3: Das gleiche Blut, aufgenommen nach 2 Monaten (Aufbewahrung im Eisschrank). (Mischblutspektrum aus Oxyhämoglobin und Cyanhämoglobin. Der Cyanhämoglobinanteil beträgt 84,2%.) — Nr. 4: Dasselbe Blut, aufgenommen nach 4 Tagen bei Aufbewahrung bei Zimmertemperatur (Extinktionsverlauf des Cyanhämoglobins).

wiedergegeben ist. Im sichtbaren Teil des Spektrums zeigt sich ein flaches Maximum im Grün bei 541 $m\mu$. Im Rot steigt die Kurve flach an. Die Kurve deckt sich mit dem Extinktionsverlauf des von *Zeynek* als „Cyanhämoglobin“ bezeichneten Körpers, dessen Lichtauslöschung von *Haurowitz* und *Vlès* gemessen worden ist. Tageslicht ist auf den Eintritt der Reaktion ohne Einfluß.

Das Cyanhämoglobin ist eine Verbindung des Cyans mit dem Methämoglobin. Die Bindung erfolgt anscheinend an das dreiwertige Eisenatom. In der älteren Literatur wird dieser Körper auch als „Cyanmethämoglobin“ bezeichnet. Dementsprechend werden alle Einflüsse auf den Blutfarbstoff, die Methämoglobin zu erzeugen in der Lage sind, bei Anwesenheit von Blausäure die Bildung von Cyanhämoglobin beschleunigen.

Versetzt man die wässrige Lösung des Hundesblutes mit $\frac{1}{4}$ Volumteil einer frisch hergestellten 5proz. wässrigen Ferricyankaliumlösung, so entsteht in wenigen Sekunden reines Cyanhämoglobin, dessen Extinktionsverlauf sich mit Abb. 1, Nr. 4, deckt. Wird der Blutlösung Cyankalium zugesetzt, zeigt sich keine Veränderung im Extinktionsverlauf. Das untersuchte Hundesblut muß demnach in ausreichendem Maße Cyan enthalten haben. Das Methämoglobin bindet nach den grundlegenden Untersuchungen von *Zeynek*, die von *Haurowitz* bestätigt wurden, in einem Molekül ein Molekül Blausäure.

Statt Ferricyankalium kann jede andere Methämoglobin erzeugende Substanz verwendet werden. Beim Arbeiten mit Ferricyanid ist jede längere Belichtung durch Tageslicht zu vermeiden, da sich aus einer wässrigen Ferricyankaliumlösung unter Einwirkung des Lichtes Blausäure abspaltet, die eine Umwandlung in Cyanhämoglobin herbeiführen kann. Das von *Bock* auf diese Weise erzeugte „Photomethämoglobin“ hat von *Zeynek* als Cyanhämoglobin nachgewiesen.

Das Cyanhämoglobin ist, worauf von *Zeynek* bereits hingewiesen, gegen Lauge recht widerstandsfähig. Eine aus Blut mit Ferricyanid und Cyankalium hergestellte 2proz. Cyanhämoglobinlösung, die mit gleichen Teilen eines Glykokoll-Natronlauge-Puffergemisches nach *Sørensen* versetzt wurde, zeigte im alkalischen Bereich bis zum p_{H} -Wert 12,399 eine gleichbleibende Lichtabsorption. In dieser Festigkeit gegen Lauge steht das Cyanhämoglobin dem Kohlenoxydhämoglobin nahe. Das Oxyhämoglobin erwachsener Personen ist gegen Lauge weniger widerstandsfähig. Ein Puffergemisch vom p_{H} -Wert 12,399 greift in einem Mischblut in erster Linie den Oxyhämoglobinanteil an und überführt ihn in alkalisches Hämatin. Auf diese Weise läßt sich eine annähernde Trennung der beiden Anteile vornehmen. Eine 2proz. wässrige Lösung des Hundesblutes, das 2 Monate im Eisschrank gestanden hatte, wurde zu gleichen Teilen mit dem angegebenen Puffergemisch versetzt und nach 6 Stunden spektrophotographisch gemessen. Der Extinktionsverlauf ist in Abb. 2, Nr. 4, eingezeichnet. Die Kurve nimmt eine Mittelstellung zum Absorptionsverlauf des reinen Cyanhämoglobins (Abb. 2, Nr. 3) und dem alkalischen Hämatin gleicher Pufferung (Abb. 2, Nr. 6) ein. Der Cyanhämoglobinanteil berechnet sich auf 53,5%. Dieser Wert stimmt mit der Messung, die unter gleichen Bedingungen an der ungepufferten Blutlösung (Abb. 1) vorgenommen wurde, recht gut überein.

Wir wissen, daß die Verbindungen des Methämoglobins durch Reduktion von dem Eisenatom, an das sie vermutlich gebunden sind, wiederum abgespalten werden. Wird das Hundesblut, das deutlich Cyanhämoglobin enthält, mit einigen Körnchen Natriumhydrosulfit reduziert, so zeigt sich nach wenigen Minuten das Spektrum des redu-

zierten Hämoglobins. Verglichen mit dem Cyanhämoglobin liegt die Verschattung mehr rotwärts. Das Maximum findet sich bei 555 $m\mu$. In Abb. 2, Nr. 1 und 3, ist der typische Extinktionsverlauf des reduzierten Hämoglobins und Cyanhämoglobins eingezeichnet.

Wird das Cyanblut erheblich faul, erfolgt durch die Reduktionsvorgänge der Fäulnis die spontane Umwandlung in reduziertes Hämoglobin, das nach Schütteln mit Luft in Oxyhämoglobin zu überführen ist. Das Blut cyanvergifteter Tiere ist gegen Fäulnis jedoch recht widerstandsfähig. Das bei der Sektion gewonnene Tierblut, das im Eisschrank aufbewahrt wurde, zeigte in den ersten 3 Monaten eine zunehmende Bildung von Cyanhämoglobin. Erst im Laufe der weiteren

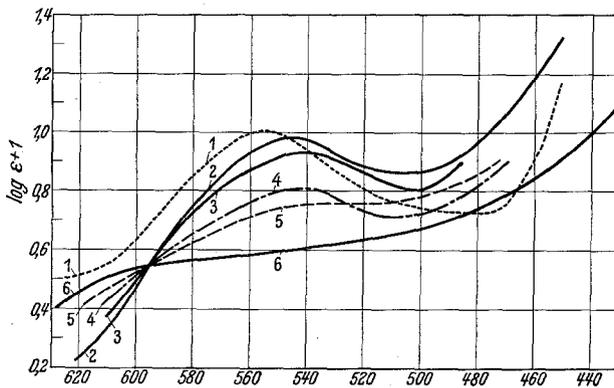
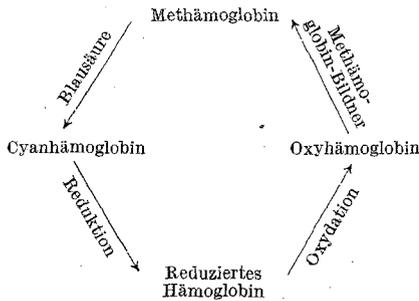


Abb. 2. Nr. 1: Reduziertes Hämoglobin. — Nr. 2: Cyanhämatin, dargestellt aus reinem, in $\frac{1}{10}$ NaOH gelösten Hämin (Mörner), mit $\frac{1}{4}$ Volumteil 10proz. KCN-Lösung versetzt. — Nr. 3: Cyanhämoglobin. — Nr. 4: Blut eines cyanvergifteten Hundes, das 2 Monate im Eisschrank aufbewahrt wurde, bei pH 12,399 (Mischblutspektrum aus alkalischem Hämatin (Nr. 6) und Cyanhämoglobin (Nr. 3), der Cyanhämoglobinanteil berechnet sich auf 53,5 %). — Nr. 5: Mischblutspektrum aus alkalischem Hämatin und Cyanhämatin, hergestellt aus Blut, das in $\frac{1}{10}$ NaOH gelöst und mit einigen Tropfen 10proz. KCN-Lösung versetzt ist. — Nr. 6: Alkalisches Hämatin, dargestellt aus Blut bei pH 12,399.

Beobachtung wurde das Blut zunehmend faul. Bei Luftabschluß erfolgte eine langsame Abspaltung des Cyans und Bildung von reduziertem Hämoglobin, das bei Sauerstoffzutritt in Oxyhämoglobin zu überführen war. Bei Zimmertemperatur setzte die Bildung von Cyanhämoglobin bereits in den ersten Tagen ein. Nach 4 Tagen war die Umwandlung in Cyanhämoglobin vollständig. Nach Verlauf einer Woche lag bereits wieder reines reduziertes Hämoglobin vor, das durch Schütteln mit Luft in Oxyhämoglobin zu überführen war. Aus diesem entwickelte sich bei Zutritt von Luft wiederum das Cyanhämoglobin, das durch die Fäulnisvorgänge wiederum in reduziertes Hämoglobin und aus diesem bei Sauerstoffzutritt in Oxyhämoglobin übergang. Die Menge des Cyanhämoglobins ist insofern von der Wechselwirkung der Oxydations- und Reduktionsvorgänge im Blut abhängig. Für die Dar-

stellung und Rückbildung des Cyanhämoglobins ergibt sich ein Kreislauf, der durch nachstehendes Schema veranschaulicht wird.



Der Nachweis von Cyanhämoglobin neben Oxyhämoglobin läßt sich in einfacher Weise auf folgende Art durchführen: Das Blut wird so weit mit Wasser verdünnt, bis die Blutlösung bei spektroskopischer Untersuchung ein deutlich erkennbares, zweistreifiges, nicht zu hartes Spektrum aufweist. Die Lösung wird mit Luft einmal kräftig durchmischt und

in zwei etwa gleiche Teile geteilt. Der eine Teil der Blutlösung wird mit einigen Körnchen $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ versetzt und die vollständige Umwandlung des Blutes in reduziertes Hämoglobin abgewartet. Durch kräftiges Schütteln mit Luft wird dieses in Oxyhämoglobin überführt. Der unvorbehandelte Teil der Blutlösung zeigt das Mischblut aus Oxy- und Cyanhämoglobin. Der reduzierte und mit Luft geschüttelte Teil der Lösung enthält reines Oxyhämoglobin gleicher Gesamtkonzentration. Die Anwesenheit von Cyanhämoglobin zeigt sich in einer Abschwächung der Intensität des ersten und Zunahme und Verbreiterung des zweiten Schattens. Bei vergleichsweiser Betrachtung unter gleichen optischen Bedingungen lassen sich auf diese Weise schon geringe Cyanhämoglobinbeimengungen im Blut erkennen.

Das Auftreten von Methämoglobin ist bei einer Cyanvergiftung nicht zu erwarten, da das sich bildende Methämoglobin sofort in Cyanhämoglobin überführt wird. Fügt man einer wässrigen Blutlösung eine Methämoglobin bildende Substanz, etwa Ferricyankalium hinzu, so entsteht, falls Blausäure zugegen, sofort das Cyanhämoglobin. Das Lichtauslöschungsvermögen dieses Körpers ist nicht sehr intensiv. Bei genügend starker Gesamtabsorption ist die Unterscheidung des asymmetrischen in Mitte Grün liegenden, matt konturierten Cyanhämoglobinschattens von dem mehrstreifigen Methämoglobinspektrum ohne Schwierigkeiten möglich.

Das Methämoglobin ist alkalischen Puffergemischen gegenüber weniger resistent als das Cyanhämoglobin. Die deutlichsten Unterschiede zeigen sich bei dem Pufferwert von $p_{\text{H}} 12,399$. 10 ccm einer aus 2 proz. Blutlösung durch Ferricyankalium hergestellten Methämoglobinlösung, die mit gleichen Teilen eines Glykokoll-Natronlauge-Puffergemisches nach *Sörensen* (4 ccm Glykokoll, natriumchloridhaltig, $\frac{1}{10}$ normal und 6 ccm $\frac{n}{10}$ Natronlauge) versetzt wird, zerfällt nach Verlauf einiger Stunden in alkalisches Hämatin. Das Cyanhämoglobin

ist diesem Puffergemisch gegenüber wesentlich widerstandsfähiger. Wird gepuffertes Mischblut mit $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ reduziert, bildet sich aus dem Methämoglobin das Eiweißhämochromogen und aus dem Cyanhämoglobinanteil reduziertes Hämoglobin. Nach Durchschütteln mit Luft geht das Eiweißhämochromogen in alkalisches Hämatin, der reduzierte Hämoglobinanteil in Oxyhämoglobin über, das sich durch seine intensive Absorption leicht erkennen läßt. Eine exakte Trennung beider Farbstoffe in einer Mischung läßt sich durch das Puffergemisch jedoch nicht erzielen.

II. Über den Nachweis des Cyans als Cyanhämochromogen.

Der Nachweis des Cyans im Blut als Cyanhämochromogen, dem eine sehr charakteristische Lichtauslöschung eigen ist, gelingt in Vergiftungsfällen nicht ohne weiteres. Das Hämochromogenspektrum entsteht aus reduziertem Hämin oder Hämatin bekanntlich erst dann, wenn das Reduktionsprodukt eine Verbindung mit einer stickstoffhaltigen Substanz, sei es Lösungs- oder Reduktionsmittel, eingeht. Bei Abwesenheit eines stickstoffhaltigen Lösungs- oder Reduktionsmittels fehlen die charakteristischen Hämochromogenstreifen, statt dessen zeigt sich an dieser Stelle im Extinktionsverlauf lediglich ein flaches plateauartiges Maximum. Nach Vorschlag von *Anson* und *Mirsky* bezeichnet man diese Körper ohne stickstoffhaltige Anlagerungsprodukte als Häme.

Es ergibt sich die interessante Frage, welches Reduktionsprodukt sich bildet, wenn mehrere stickstoffhaltige Substanzen, die Verbindungen eingehen, in der Lösung zugegen sind. Zwei Möglichkeiten bestehen. Es könnte sein, daß mehrere stickstoffhaltige Substanzen mit dem reduzierten Hämin oder Hämatin zu einem einzigen neuen Körper vereinigt werden, oder daß die Bindung des einen die Anlagerung des anderen ausschließt. Die spektrophotometrische Untersuchung des entstandenen Reduktionsproduktes ist zur Klärung dieser Frage in ausgezeichnetem Maße geeignet. Entsteht ein Mischprodukt, so nimmt der Extinktionsverlauf eine dem Mischungsverhältnis jeweils entsprechende Mittelstellung zwischen den Spektren der reinen Körper ein. Bildet sich ein neuer Stoff, so wird dieser eine Lichtabsorption zeigen, die eine entsprechende Mittelstellung nicht einnimmt. Die Untersuchung der Hämochromogene bei Anwesenheit mehrerer stickstoffhaltiger Substanzen, die mit dem Reduktionsprodukt Verbindungen eingehen können, ist bei der Vielgestaltigkeit der möglichen Kombinationen eine interessante Studie. Für die vorliegenden Untersuchungen interessieren insbesondere die Beziehungen von Gemischen aus Serumweiß, Blausäure und Hydrazin zur Hämochromogenbildung.

Versetzt man eine alkalische Häminlösung mit Serumweiß und Alkalicyanid, so zeigt sich nach Reduktion mit Natriumhydrosulfit

die Kurve eines Mischblutes, die eine dem Mischungsverhältnis entsprechende Lage zwischen dem aus Hämin dargestellten Cyanhämochromogen und dem Eiweißhämochromogen einnimmt. Abb. 4 erläutert diese Verhältnisse.

Setzt man einer aus reinem Hämin dargestellten Hydrazinhämochromogenlösung in zunehmender Menge Cyankaliumlösung zu, so zeigt sich in zunehmendem Maße die Lichtauslöschung des Cyanhämochromogens. Die in Abb. 3 dargestellte Mischblutkurve ist unter Anwendung gleicher molarer Zusätze von Hydrazinsulfat und Cyankalium zu einer alkalischen Häminlösung nach Mörner gewonnen.

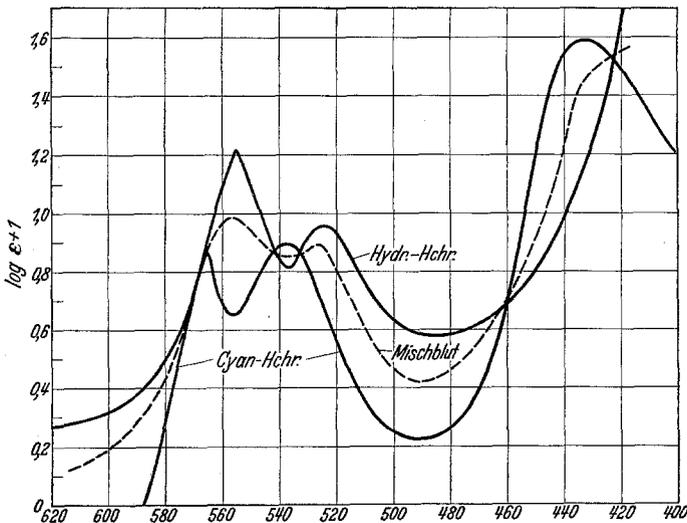


Abb. 3. Hydrazin-Hämochromogen, dargestellt aus Hämin, mit Hydrazinsulfat reduziert. Cyanhämochromogen aus Hämin in KCN-haltigem Lösungsmittel mit $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ reduziert. Mischblut, dargestellt aus in NaOH gelöstem Hämin, dem je ein Volumteil einer 0,1 molaren Hydrazinsulfat- und Cyankaliumlösung zugefügt ist.

Der Extinktionsverlauf dieses Körpers kennzeichnet sich als ein entsprechendes Mischblut aus Cyanhämochromogen und Hydrazinhämochromogen.

Die Beobachtung dieses Verhaltens ist für die Darstellung des Cyanhämochromogens von prinzipieller Bedeutung. *Haurowitz* berichtet 1927 über die Lichtauslöschung einiger Hämochromogene bei Gegenwart von Cyaniden und verwendet bei seinen Untersuchungen als Reduktionssubstanz das Hydrazinhydrat. Die Kurven, die er wiedergibt, zeigen dementsprechend einen anderen Extinktionsverlauf, als es den reinen Cyanhämochromogenen entspricht.

Auch das im gleichen Jahre von *O. Schumm* erschienene Buch über die spektrochemische Analyse natürlicher organischer Farbstoffe läßt in dem Kapitel über das Cyanhämatin diese Verhältnisse noch unbe-

rücksichtigt. Bei reiner alkalischer Hämatinlösung fand *Schumm* nach Zusatz von gleichen Teilen einer 30proz. Cyankaliumlösung nach Reduktion mit etwas Schwefelammonium ein zweistreifiges Spektrum, von dem der zweite Schatten breiter und um ein Geringes dunkler war als der erste. Das erste Maximum beschreibt *Schumm* bei 567 bis 568 m μ , das zweite von 537—538 m μ .

Werden die Untersuchungen nicht an reinen eiweißfreien Produkten vorgenommen oder werden als Lösungsmittel oder zur Reduktion stickstoffhaltige Substanzen benutzt, so erhält man nicht das Spektrum des reinen Cyanhämochromogens. Ist Cyan in großem Überschuß vorhanden, so wird die Absorption fast dem reinen Cyanprodukt entsprechen. *Ziemke* fand, wenn er aus Blut dargestelltes alkalisches Hämatin zu gleichen Teilen mit 10proz. Cyankaliumlösung vermischte, oder Cyankaliumlösung auf getrocknetes Blut einwirken ließ, nach Reduktion mit Schwefelammonium oder Natriumhydrosulfit den ersten Schatten bei 577—562 m μ , den zweiten bei 548—532 m μ . Beide Schatten waren in ihrer Intensität von gleicher Stärke.

Das aus Hämin dargestellte Cyanhämochromogen hat ein zweistreifiges Spektrum. Das erste Maximum liegt bei 566 m μ . Das zweite etwas stärkere Maximum hat seinen höchsten Punkt bei 538,5 m μ . Die Hauptabsorption im Violett liegt bei 432 m μ . Verglichen mit dem Eiweißhämochromogen zeigt sich eine deutliche Rotverschiebung des gesamten Spektrums. Der erste Schatten besitzt nicht die charakteristische Härte, die die meisten übrigen Hämochromogene auszeichnet.

Tabelle 1.

log $s + 1$	Cyanhämin bei Wellenlänge in m μ				Cyanhämochromogen bei Wellenlänge in m μ			
1,8	—	—	—	—	—	—	—	(432)
1,7	—	—	(421,0)	—	—	—	—	437,5 426,0
1,6	—	—	429,5 409,0	—	—	—	—	443,5 418,5
1,5	—	—	435,5 398,5	—	—	—	—	446,0 412,0
1,4	—	—	440,0 385,5	—	—	—	—	448,5 406,0
1,3	—	—	445,5 —	—	—	—	—	450,5 399,5
1,2	—	—	451,5 —	—	—	—	—	452,5 392,0
1,1	—	—	458,5 —	—	—	—	(538,5)	454,0 —
1,0	—	—	466,3 —	(566,0)	542,5	532,2	456,0	—
0,9	(541,0)	474,5	—	569,5	562,5	548,0	527,5	457,5 —
0,8	563,5	528,5	486,5 —	572,0	558,5	553,5	523,0	459,5 —
0,7	574,0	(510,0)	—	574,5	(556,0)	519,0	462,0	—
0,6	582,5	—	—	576,5	—	515,5	465,5	—
0,5	590,0	—	—	578,0	—	510,5	469,5	—
0,4	597,0	—	—	580,0	—	502,5	477,5	—
0,3	604,0	—	—	582,5	—	—	(488,0)	—
0,2	611,2	—	—	585,5	—	—	—	—
0,1	622,3	—	—	589,0	—	—	—	—
0,0	634,5	—	—	605,0	—	—	—	—

Die logarithmischen Werte der Extinktion des aus reinem Hämin (*Mörner*) dargestellten Cyanhämins und Cyanhämochromogens ergeben sich aus vorstehender Tab. 1.

Im Blut einer Cyanvergiftung wird man erwarten müssen, daß das mengenmäßige Verhältnis zwischen Eiweiß und Blausäure sehr zuungunsten des Cyans gelagert ist. Wird die wässrige Blutlösung einer Cyanvergiftung mit gleichen Teilen $\frac{n}{10}$ normal Natronlauge versetzt und mit einigen Körnchen $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ reduziert, zeigt sich ein Extinktionsverlauf, der sich von dem reinen Eiweißhämochromogen kaum unter-

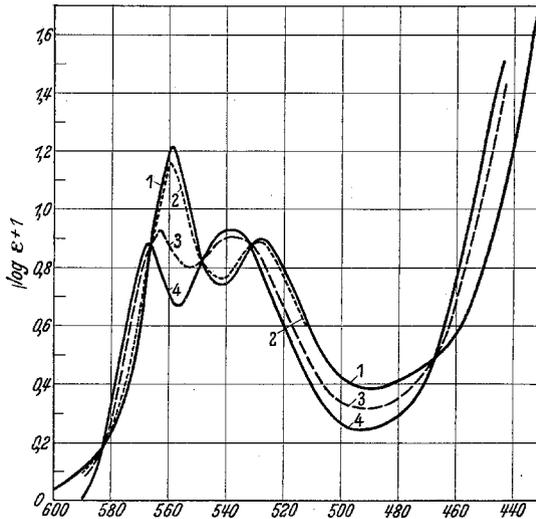


Abb. 4. Nr. 1: Eiweißhämochromogen, dargestellt aus reinem in $\frac{n}{10}$ NaOH gelöstem Hämin (*Mörner*), mit $\frac{1}{2}$ Volumteil in $\frac{n}{10}$ NaOH gekochtem Blutsrum versetzt und mit $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ reduziert. — Nr. 2: Blut eines cyanvergifteten Hundes, in $\frac{n}{10}$ NaOH gelöst und mit $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ reduziert. — Nr. 3: Mischblut aus Eiweißchromogen und Cyanhämochromogen (Mischung aus Lösung 1 und 4). — Nr. 4: Cyanhämochromogen, dargestellt aus in $\frac{n}{10}$ NaOH gelöstem Hämin mit $\frac{1}{4}$ Volumteil 10proz. KCN-Lösung versetzt und mit $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ reduziert.

scheidet (Abb. 4, Nr. 2). Der Nachweis von Cyan als Hämochromogen im Blut gelingt bei der reichlichen Anwesenheit von Serumeiweißstoffen nicht, oder nur dann, wenn das Eiweiß aus der Lösung entfernt wird, oder die Isolierung der Cyanfarbstoffverbindung aus dem Blut möglich wäre. Derartige Verfahren lassen sich nicht oder nur mit größten Schwierigkeiten durchführen.

Es erwies sich jedoch ein anderer Weg als gangbar und äußerst schnell und bequem zum Ziele führend, aus dem Blut oder den Organen einer Blausäurevergiftung das Cyan als Cyanhämochromogen darzustellen. Diese Probe dürfte zu den empfindlichsten Methoden des Blausäurenachweises überhaupt gehören. Der Nachweis wird an der von cyanvergifteten Leichenorganen ausgehenden Blausäureentwick-

lung, die in einem Tropfen einer alkalischen reinen Häminlösung niedergeschlagen wird, vorgenommen. Hinsichtlich ihrer Ausführung hat dieser Nachweis mit dem von *Neureiter* angegebenen Verfahren gewisse Ähnlichkeit.

Die untersuchten Leichenorgane (Blut, Mageninhalt, Körperflüssigkeiten, Gehirn oder sonstige Organe) werden, evtl. nach Zerkleinerung, mit Wasser versetzt und mit $\frac{1}{3}$ des Volumens mit 10proz. Schwefelsäure angesäuert. Alle löslichen Cyanide, mit Ausnahme des Cyanquecksilbers, werden hierbei schon in der Kälte unter Entwicklung von Blausäure zersetzt. Das Quecksilbercyanid wird erst bei Anwesenheit von löslichen Chloriden (Kochsalz) durch Erwärmen in Freiheit gesetzt. Die Blausäureentwicklung wird in einem etwa 50—100 ccm fassenden Glastrog, der sich durch einen Objektträger verschließen läßt, vorgenommen. Das Gefäß muß fast bis zum Rande, so daß nur ein kleines Luftvolumen übrigbleibt, gefüllt sein. An die Unterfläche des Objektträgers wird 1 Tropfen einer 0,2proz. in $\frac{n}{10}$ -NaOH gelösten reinen Hämin- oder Hämatinlösung gebracht. Die Blausäure wird durch die Natronlauge niedergeschlagen. Sie verbindet sich mit dem in dem Tropfen enthaltenen Hämin oder Hämatin zu Cyanhämmin bzw. Cyanhämatin. Ist Blausäure zugegen, wird der Tropfen schon nach wenigen Minuten vom Rande her rotbraun. Ist der Farbumschlag erfolgt, wird bei möglichst schwacher mikroskopischer Vergrößerung die mikrospektroskopische Untersuchung vorgenommen. Ist ein Farbumschlag nicht erkennbar, wird zweckmäßigerweise etwa $\frac{1}{2}$ Stunde und länger mit dieser Untersuchung gewartet.

Das Cyanhämmin ist an dem mattkonturierten Streifen im Grün bei der mikrospektroskopischen Betrachtung erkennbar. Wird der Tropfen mit einigen Körnchen pulverisierten Natriumhydrosulfits reduziert, schlägt die Farbe ins Hellrot um. Bei spektroskopischer Untersuchung zeigen sich die beiden Streifen des Cyanhämochromogens. Der erste Schatten liegt im Grün-Gelb, der zweite im Grün. Der erste Schatten ist schmaler als der zweite, der ein wenig dunkler erscheint. Das Spektrum ist so charakteristisch, daß es sich leicht erkennen läßt. Nach einigen Minuten tritt durch den Luftsauerstoff Oxydation ein.

Liegt Blausäure nicht vor, so behält der Tropfen seine ursprüngliche, graubraune Farbe bei. Bei mikrospektroskopischer Betrachtung zeigt sich eine matte Verschattung im Rot-Gelb. Wird mit $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ reduziert, entsteht nunmehr das Hämspektrum, das eine matte Verschattung im Gelb bis Grün aufweist. Es fehlt die charakteristische Zweistreifigkeit an der beschriebenen Stelle, die das Cyanhämochromogen auszeichnet.

Zur Ausführung dieser Probe benutzt man einen einzigen Tropfen einer 0,2proz. Häminlösung. Die in diesem Tropfen enthaltene Häminmenge berechnet sich auf etwa 0,1 mg. Das nach dem Verfahren von *Mörner* hergestellte Hämin hat die Formel $\text{C}_{34}\text{H}_{33}\text{N}_4\text{FeO}_4\text{Cl}$. Unter Berücksichtigung dieses hohen Molekulargewichts genügen etwa 0,004 mg Blausäure, um die in dem verwendeten Tropfen enthaltene Häminmenge mit Blausäure abzusättigen. Es müßte hiernach möglich sein, etwa 0,01 mg KCN in den untersuchten Leichenteilen oder Flüssigkeiten zu erfassen, wobei das Flüssigkeitsquantum, in dem diese Menge gelöst ist, bei der Art der Probe von untergeordneter Bedeutung ist. In dem Blut zweier durch intrathorakale Injektion cyanetöteter Hunde gelang der Nachweis von Blausäure als Cyanhämochromogen in je 1 ccm Blut.

Vlès bedient sich zum Nachweis der Blausäure im Blut einer sog. Sensibilisierungsreaktion, die er als modifizierte *Preyersche* Probe bezeichnet. Das zu untersuchende Blut wird auf 1:100 mit Wasser verdünnt. Zu 5 ccm dieser Lösung werden 3 Tropfen einer 7 prom. wässrigen Kaliumpermanganatlösung zugefügt.

Nach ungefähr $\frac{1}{2}$ Minute wird die Lösung mit $\frac{1}{4}$ — $\frac{1}{2}$ g pulverisierter Soda versetzt und mit Natriumhydrosulfit reduziert. Bei Anwesenheit von Blausäure soll neben reduziertem Hämoglobin das Spektrum des Cyanhämochromogens auftreten. In ihrem Ausfall ist diese Probe unsicher. *Vlès* verlangt jeweils die Vornahme von Kontrolluntersuchungen.

Nach den bisherigen Untersuchungen ist bei einem derartigen Analysengange das Auftreten von Cyanhämochromogen nicht zu erwarten. Der Zusatz von Kaliumpermanganat bewirkt die Bildung von Methämoglobin. Bei Anwesenheit von Blausäure bildet sich Cyanhämoglobin. *Vlès* bezeichnet diesen Körper als „Cyanhämatin“. Die Soda bewirkt den Übergang des sauren in alkalisches Methämoglobin. Oxyhämoglobin, Methämoglobin wie auch Cyanhämoglobin werden bei dieser Versuchsanordnung nicht in Hämatin überführt. Das Methämoglobin ist, wie gezeigt wurde, in alkalischen Puffergemischen sogar weniger widerstandsfähiger als das Cyanhämoglobin. Aber selbst wenn das Cyanhämoglobin vor den übrigen Blutderivaten in Hämatin zu überführen wäre, so muß es nach den bisherigen Untersuchungen zweifelhaft erscheinen, ob bei der reichlichen Anwesenheit von Eiweißstoffen das Hämatin als Cyanhämochromogen sichtbar in Erscheinung tritt. Nach Reduktion mit Natriumhydrosulfit bildet sich sowohl aus dem Methämoglobin wie auch aus dem Cyanhämoglobin das reduzierte Hämoglobin. Beim Cyanhämoglobin zeigt sich hierbei vorübergehend ein Spektrum, das eine intensive Verschattung im Grün aufweist. Anscheinend hält *Vlès* dieses Zwischenprodukt für ein Cyanhämochromogen, das er im Gegensatz zu dem in cyanhaltigen Lösungsmitteln auftretenden „normalen Hämochromogen“ und dem eigentlichen Cyanhämochromogen als „Hämochromogen Z“ bezeichnet. Er bestimmt die Maxima dieses Körpers bei $550\text{ m}\mu$ und $520\text{ m}\mu$. Bei zahlreichen nach Vorschrift durchgeführten Blutuntersuchungen erhielt ich als Endprodukt stets das reduzierte Hämoglobin, wobei bei cyanhaltigem Blut das erwähnte Zwischenstadium durchlaufen wurde.

III. Über die Bildung von Cyanhämatin.

Die Hämine und Hämatine sind ähnlich wie die Hämochromogene außerordentlich reaktionsfähige Körper, die mit fast allen Lösungsmitteln Additionsprodukte liefern. Am bekanntesten sind die Verbindungen mit Pyridin, Ammoniak, Blausäure und ähnlichen Stoffen. Auch die Serumweißkörper des Blutes werden nach den Untersuchungen von *Heilmeyer* addiert.

Wenn in einem Lösungsmittel nun mehrere Stoffe vorhanden sind, die Additionsprodukte liefern, so ergeben sich für die Hämine und Hämatine ähnliche Beziehungen wie für die Hämochromogene. Versetzt man in $\frac{1}{10}$ Natronlauge gelöstes Blut mit einigen Tropfen einer 5proz. Cyankaliumlösung, so ändert sich die Lichtauslöschung zunächst nur

wenig. Neben dem Streifen des alkalischen Hämätins finden sich zwei matte Verschattungen im Grün. Der Extinktionsverlauf dieses Körpers zeigt einen steileren Verlauf, als es dem alkalischen Hämatin bei diesem Pufferwert zukommt. Setzt man mehr KCN hinzu, verschwindet schließlich das Spektrum des alkalischen Hämätins. Statt dessen zeigen sich zwei matte Verschattungen im Grün. Die Extinktionskurve nimmt eine Mittelstellung (Abb. 2, Nr. 5) zwischen dem aus Blut hergestellten alkalischen Hämatin (Abb. 2, Nr. 6) und dem Spektrum des Cyanhämins (Abb. 2, Nr. 2) ein. Wird schließlich Cyankalium in größerem Überschuß zugefügt, zeigt das Blut einen Extinktionsverlauf, der sich mit dem aus reinem Hämin dargestellten Cyanhämin deckt (Abb. 2, Nr. 2). Das Cyanhämin zeigt eine matt konturierte Verschattung im Grün, die sich bei spektroskopischer Betrachtung mit gradsichtigem Handspektroskop von dem Spektrum des Cyanhämoglobins nicht unterscheiden läßt. Das Maximum liegt bei $545\text{ m}\mu$. Im Violett liegt die Hauptabsorption bei $421\text{ m}\mu$. Horowitz beschreibt die Hauptabsorption des in Cyannatrium-haltiger alkoholischer Natronlauge gelösten Hämins bei $550\text{ m}\mu$. Schumm bestimmte die Hauptabsorption von einer reinen alkalischen Hämatinlösung nach Zusatz von gleich viel 30proz. Cyankaliumlösung bei ungefähr $553\text{ m}\mu$.

Die Unterscheidung des Cyanhämins oder Cyanhämätins vom Cyanhämoglobin läßt sich in einfachster Weise durch die Reduktion vornehmen. Aus den Häminen und Hämätinen bilden sich nach Zusatz von $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ die Hämochromogene, die nach Durchmischen mit Luft wiederum in ihre ursprüngliche Oxydationsstufe zurückkehren; aus dem Cyanhämoglobin bildet sich das reduzierte Hämoglobin, das durch Schütteln mit Luft in Oxyhämoglobin zu überführen ist.

Bei Unwesenheit von Serumeiweiß und Blausäure entsteht nach Reduktion mit $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ das diesem Mischungsverhältnis entsprechende Spektrum, durch das auch die Lichtauslöschung der nicht reduzierten Lösung bestimmt wurde.

Das Cyanhämoglobin wird durch stärkere Lauge in Cyanhämatin überführt. Ein Puffergemisch von $p_{\text{H}} 12,399$ bewirkt bei Zimmertemperatur erst nach mehreren Tagen die allmähliche Überführung in Cyanhämatin.

Das Blut eines cyanvergifteten Hundes, daß in $\frac{n}{10}$ NaOH ($p_{\text{H}} 13,06$) gelöst wurde, zeigte mit geringen Abweichungen bei dem vorliegenden Überschuß an Serumeiweißkörpern die Lichtauslöschung des alkalischen Hämätins. Neben der Verschattung im Rot, die dem alkalischen Hämatin zuzuschreiben ist, fanden sich bei stärkerer Gesamtabsorption zwei matte Verschattungen im Grün, die auf die Absorption des Cyanhämatinanteils zurückzuführen sind. Diese Zweistreifigkeit im Grün erklärt sich aus der Art unserer Lichtempfindung, die von Weigert näher analysiert ist, und auf deren Besonderheiten R. M. Mayer unlängst in dieser Zeitschrift hingewiesen hat. Mit Natriumhydrosulfid reduziert, ergibt die Lösung, entsprechend dem reichlichen Eiweißgehalt ein nur wenig verändertes Eiweißhämochromogenspektrum (vgl. Abb. 4).

Gegen Säure ist das Cyanhämoglobin verhältnismäßig resistent. Bei Phosphat- und Citratpuffergemischen nach *Sørensen* tritt erst bei p_{H} 4,958 eine matte Trübung ein. Bei p_{H} 4,830 wird das Cyanhämoglobin als flockiger brauner Niederschlag ausgefällt.

IV. Über die Bildung von Methämoglobin im Blut.

Aus den bisherigen Untersuchungen ergibt sich, daß die Bindung der Blausäure an den Blutfarbstoff in Vergiftungsfällen im wesentlichen erst nach dem Tode erfolgt. Bei unseren Tierversuchen sahen wir das Cyanhämoglobin frühestens 12 Stunden nach erfolgtem Tode auftreten. Das Blut dieses vergifteten Hundes war bei der Sektion bereits stark hämolytisch. Wollte man die Methämoglobin-(Cyanhämoglobin-) Bildung bei Cyanvergiftungen graphisch darstellen, so ergäbe sich eine Kurve, die bis zum Eintritt des Todes einen auf der O-Linie liegenden horizontalen Verlauf zeigen würde. Nach dem Eintritt des Todes folgte mit Beginn der Hämolyse bis zum Eintritt der Reduktionsvorgänge der Fäulnis ein allmählicher Anstieg.

Es ergibt sich die Frage, welche Umstände es verhindern, daß die Blausäure nicht bereits im lebenden Körper den Farbstoff zu den Produkten umwandelt, die erst in der Leiche beobachtet werden. Seit *Scheele* im Jahre 1782 die Blausäure entdeckt und *Schrader* im Jahre 1803 ihre Giftigkeit erkannte und *Preyer* die Beziehungen zum Blutfarbstoff beschrieben, hat die Tatsache, daß im Blut Cyanvergifteter keine spektroskopisch sichtbaren Veränderungen anzutreffen sind, immer wieder besonderes Interesse, insbesondere in Fachkreisen, erregt. Eine klare Antwort auf diese Frage ist bisher noch nicht gegeben worden. *Vlès* glaubt, daß im zirkulierenden Blut das in den Erythrocyten eingeschlossene Hämoglobin „durch irgendwelche unbekannt Schutzstoffe“ vor dem Angriff der Cyanverbindungen bewahrt bleibe.

Untersucht man bei einer Cyanvergiftung den Inhalt der roten Blutkörperchen von dem mehr oder minder durch Hämolyse rot gefärbten Serum gesondert, so ergibt sich die überraschende Tatsache, daß der Inhalt der in Kochsalz gewaschenen roten Blutkörperchen kein Cyanhämoglobin enthält und daß sich in diesem auch im Laufe der weiteren Beobachtung kein Cyanhämoglobin bildet. Selbst wenn man den Farbstoff der gewaschenen roten Blutkörperchen nach Hämolyse durch Ferricyankalium in Methämoglobin überführt, entsteht kein Cyanhämoglobin. Der Inhalt der roten Blutkörperchen ist demnach blausäurefrei geblieben. Nur der in das Serum ausgetretene Blutfarbstoff enthält das Cyanhämoglobin. Die Zellwand der roten Blutkörperchen hat also das Eindringen der Blausäure oder des Cyanradikals in das Zellinnere verhindert. Erst wenn die Zellwand zerstört und der Blutfarbstoff in das Blutserum ausgetreten ist, ist er der Einwirkung der Blausäure zugänglich.

Im Reagensglas zeigt sich ein durchaus gleiches Verhalten. Versetzt man eine in physiologischer Kochsalzlösung hergestellte Blutkörperchenaufschwemmung mit einer isotonischen (0,154 Molar) wässrigen Cyankaliumlösung, die durch gleiche Teile einer 0,154 normal Salzsäure neutralisiert ist, so tritt, solange die Blutkörperchen in der Suspension erhalten sind, keine Cyanhämoglobinbildung ein. Werden die Blutkörperchen gewaschen und die hämolysierte Blutlösung mit Ferricyanid versetzt, bildet sich kein Cyanhämoglobin. Die Zellwand der roten Blutkörperchen hat demnach ein Eindringen der Blausäure oder CN-Ionen in das Zellinnere verhindert.

Unter Berücksichtigung dieser Feststellung ist es verständlich, daß bei einer Cyanvergiftung in den roten Blutkörperchen keine Verbindung des Cyans mit dem Blutfarbstoff eintreten kann und daß nur im hämolytischen Blutserum die Bildung von Cyanhämoglobin zu erwarten und anzutreffen ist. Da der Tod in Vergiftungsfällen meist sehr schnell eintritt, die Umwandlung von Oxyhämoglobin in Cyanhämoglobin aber längere Zeit in Anspruch nimmt, so vollzieht sich die Bildung von Cyanhämoglobin vorzüglich erst nach dem Tode.

Für die Alkalisalze der Ferricyanwasserstoffsäure, die im Reagensglase den Blutfarbstoff im Augenblick in Methämoglobin umwandeln, ist die Zellmembran in ähnlicher Weise undurchlässig. In isotonischer Ferricyankaliumlösung beginnt bei Brutschranktemperatur die Methämoglobinbildung innerhalb der roten Blutkörperchen erst nach 72 Stunden.

Sehr leicht durchlässig ist die Zellmembran dagegen für Natriumnitritlösung, das in ähnlich kurzer Zeit wie in hämolysiertem Blut den Blutfarbstoff der roten Blutkörperchen in Methämoglobin und Stickoxydhämoglobin umwandelt. Liegt im Zellinneren der roten Blutkörperchen Methämoglobin vor, ist die Zellwand nunmehr auch für Alkalicyanide durchlässig. Ob die Durchlässigkeit durch die chemische Affinität des Methämoglobins zum Cyan bedingt, oder ob die NO_2 -Ionen die Undurchlässigkeit der Membran gestört haben, also gleichsam als Wegbereiter dienen, ist nicht zu entscheiden.

Das chlorsaure Kalium baut im Reagensglase den Blutfarbstoff im Verlauf einiger Stunden zu Hämatin ab. Ist in der Lösung jedoch Cyan zugegen, erfolgt die Umwandlung nur bis zum Methämoglobin. Es bildet sich als Endprodukt das Cyanhämoglobin. Eine Blutkörperchenaufschwemmung wird durch eine 0,154 molare KClO_3 -Lösung im Brutschrank zu einer braunen, klebrigen, in Wasser, Alkohol und Äther unlöslichen Masse zusammengebacken. Bei Anwesenheit von Cyankalium bleiben die Blutkörperchen dagegen erhalten. Nach etwa 48 Stunden beginnt im Zellinneren die Bildung von Cyanhämoglobin. Die Zellwand der roten Blutzellen ist demnach für das chlorsaure Kalium in ähnlicher Weise wie für Ferricyanide schwer durchlässig.

Das Kaliumpermanganat führt in kurzer Zeit zu einer Zerstörung der Zellwand. Der Blutfarbstoff wird über das Methämoglobin hinaus weiter zerstört.

Die vorgenommenen Untersuchungen, deren ausführliche Protokolle Herr Kollege *Vieweger* in einer Dissertation zusammenstellen wird, lassen sich in folgender Tab. 2 zusammenfassen.

Tabelle 2.

Isotonische (0,154 molare) Lösungen von	In wäßriger hämolytischer Blutlösung Bildung von		Blutkörperchenaufschwemmung in Lösung, Bildung	
	Methämoglobin	Cyanhämoglobin	Hämolyse	Methämoglobin
KCN (durch 0,154 normal Salzsäure neutralisiert)	—	Nach 48 Std. (Brutschrank)	Nach 72 Std. (Brutschrank)	—
$K_3Fe(CN)_6$	sofort	Nach Einwirkung v. Tageslicht im Verlauf mehrerer Tage	Nach 1 Woche beginnend (Brutschrank)	Nach 72 Stunden geringes Methämoglobinspektrum
$NaNO_2$	Nach 1 Minute Methämoglobin und Stickoxydhämoglobin	Nach Zusatz v. KCN in wenigen Sekunden Cyanhämoglobin	—	Nach 1 Min. Methämoglobin und Stickoxydhämoglobin
$KClO_3$	Nach 14 Std. (Brutschrank) weitgehender Abbau ohne charakteristisches Spektrum	Nach Zusatz v. KCN nach 72 Std. Cyanhämoglobin (Brutschrank)	Die Blutkörperchen werden zu einem unlöslichen Brei zusammengebunden	Weitgehend. Abbau, kein Spektrum
$KMnO_4$	Nach wenigen Min. Methämoglobin, später weiterer Abbau	Nach Zusatz v. KCN Cyanhämoglobin, kein weiterer Abbau	Nach wenigen Minuten Hämolyse	—

Ob die Methämoglobinbildung bei den einzelnen Giftarten im lebenden Organismus in gleicher Weise vor sich geht wie im Reagensglase, ist bisher nicht systematisch untersucht worden. Man hat diesem unterschiedlichen Verhalten der intra- und extracellulären Methämoglobinbildung bisher keine besondere Aufmerksamkeit geschenkt und die Methämoglobinbildung lediglich im hämolysierten Gesamtblut studiert.

Bei einem Meerschweinchen, das mit chlorsaurem Kalium getötet wurde, fand sich lediglich im hämolytischen Serum Methämoglobin. Die Blutkörperchen enthielten kein Methämoglobin. Systematische Untersuchungen größeren Umfanges, die zu allgemeinen Grundsätzen berechtigen, haben wir bisher nicht vorgenommen. In einem Fall von Arsenwasserstoffvergiftung fand *Schrader* nach längerem Stehen an

Tabelle 2.

physiologischer Kochsalz- von	Der Inhalt der gewaschenen roten Blutkörperchen	Bemerkungen
Cyanhämoglobin		
Nach 72 Stunden begin- nend (Brutschrank)	Blutkörperchen nach 5 Stun- den Reaktionsdauer ge- waschen enthalten kein Cyan. Desgl. nach 48 Stunden Reaktionsdauer	Die gewaschenen roten Blutkörperchen wer- den hämolytisiert. Im hämolytischen Blut bildet sich kein Cyanhämoglobin. Auch nach Zusatz von Ferricyanid entsteht kein Cyanhämoglobin. In die Zellen ist das Cyanradikal innerhalb der Beobachtungs- zeit nicht eingedrungen
—	Nach 5 Stunden Reaktions- dauer kein Methämoglo- bin. Nach 72 Std. Spuren von Methämoglobin. Nach Zusatz von KCN: Cyan- Hgb. + O ₂ -Hgb	Die Zellwand der roten Blutkörperchen ist für Ferricyanidionen erst nach mehreren Tagen (72 Stunden) durchlässig. Enthalt- en die Zellen Methämoglobin, bietet die Zellwand den CN-Ionen keinen Wider- stand mehr
Nach Zusatz von KCN bildet sich in wenigen Sekunden Cyanhämoglo- bin	Methämoglobin. Nach Zu- satz von KCN Cyan- hämoglobin	Die Zellwand der roten Blutkörperchen ist für NO ₂ durchlässig. Nach Zusatz von KCN bildet sich innerhalb der Zellen Cyanhämoglobin
Nach Zusatz von KCN zeigt sich nach 2 Tag. (Brutschrank) keine Hämolyse und das reine Oxyhämoglobin- spektrum. Nach 72 Stunden unter Ein- tritt von Hämolyse Cyanhämoglobin.	Nach 48 Stunden Reaktions- dauer bei Anwesenheit v. KCN Cyanhämoglobin- bildung	Die Anwesenheit von Cyankalium verhindert den weiteren Abbau des Farbstoffes. Bei Anwesenheit von KCN entsteht als End- produkt Cyanhämoglobin. Die Bildung v. Methämoglobin beginnt bei KClO ₃ erst nach längerer Zeit. Die Zellwand der roten Blutkörperchen ist bei Anwesenheit von KCN, das den weiteren Abbau hindert, für ClO ₃ in ähnlicher Weise schwer durch- gängig, wie für Ferricyanide
—	—	KMnO ₄ bewirkt im Reagensglase Hämolyse. Bei Anwesenheit von KCN entsteht als Endprodukt sofort Cyanhämoglobin

der Luft nur im Blutserum Methämoglobin, in den Blutkörperchen dagegen Oxyhämoglobin.

Das eigentümliche Verhalten des chlorsauren Kaliums und Kaliumpermanganats, den Blutfarbstoff bei Anwesenheit von Blausäure nur bis zum Methämoglobin bzw. Cyanhämoglobin abzubauen, gestattet selbst den Nachweis geringer Spuren von Blausäure im Blut. Wird

eine blausäurefreie wässrige Blutlösung mit etwa $\frac{1}{4}$ Volumenteil einer kaltgesättigten Lösung von chlorsaurem Kalium versetzt, so wird das Blut bei Zimmertemperatur nach 48—72 Stunden über Methämoglobin zu einem Produkt abgebaut, das selbst bei starker Gesamtabsorption keine besondere Lichtauslöschung aufweist. Der Cyanwasserstoff stabilisiert das Methämoglobin als Cyanhämoglobin. Ein weiterer Abbau erfolgt im Verlauf mehrerer Tage nicht. Das Kaliumpermanganat verhält sich ganz ähnlich. Auch hier bildet sich, falls Blausäure zugegen, als Endprodukt das Cyanhämoglobin. Die Umwandlung in Methämoglobin bzw. Cyanhämoglobin vollzieht sich in wenigen Minuten. Das Blut cyanvergifteter Hunde zeigte nach Zusatz von chlorsaurem Kalium oder Kaliumpermanganat (in 2 prom. Lösung, $\frac{1}{4}$ Volumenteil zu 1—2 proz. Blutlösung) das Spektrum des Cyanhämoglobins.

Zur Entgiftung des Organismus bei Blausäurevergiftungen bediente man sich seit den Untersuchungen von *Lang* im Jahre 1895 schwefelhaltiger Mittel (Natriumthiosulfat, kolloidaler Schwefel, Natriumtetrathionat usw.), die das Cyanradikal in den Rhodankomplex überführen sollen. Neuerdings werden neben anders wirkenden Stoffen Entgiftungsmethoden angegeben, die auf einer schnellen Bildung von Methämoglobin im Blut, an das sich die Blausäure anlagert, beruhen. Als Heilmittel dieser Art werden Natriumnitrit, Amylnitrit, Methylenblau u. a. empfohlen. Bei vorbehandelten Tieren sahen *Wirt* und *Lämmerhirt* die Vergiftung durch Blausäureeinatmung weniger rasch verlaufen als bei unbehandelten Kontrolltieren. Von den Methämoglobinbildnern erwies sich das Natriumnitrit in dieser Hinsicht am wirksamsten. Diese Untersuchungen stehen mit der Tatsache, daß Natriumnitrit im Reagensglase eine intracellulär gelagerte Methämoglobinbildung erzeugt, im Einklang. Bei nichttödlichen Vergiftungen war durch die nachfolgende Behandlung mit Amylnitrit die Erholung der vergifteten Tiere beschleunigt. Untersuchung über die therapeutische Darreichung von reinem Methämoglobin sind bisher nicht vorgenommen worden. Wir haben diesbezügliche Versuche in Angriff genommen.

V. Untersuchungen über die Bildung und den Nachweis von Cyanhämoglobin im menschlichen Blut bei tödlich endender Blausäurevergiftung.

Beim Nachweis von Cyanhämoglobin im Blut einer Cyanvergiftung wird man nach den vorliegenden Untersuchungen davon ausgehen müssen, daß die Einwirkung der Blausäure auf den Blutfarbstoff die Zerstörung der roten Blutkörperchen zur Voraussetzung hat. Erst mit dem Eintritt der Hämolyse ist die Bildung von Cyanhämoglobin zu erwarten. Je geringer die Hämolyse fortgeschritten, je vollkommener wird die Absättigung des ausgetretenen Blutfarbstoffs mit der im Serum befindlichen Blausäure sein oder werden können. Ist die Hämolyse stark ausgeprägt oder nahezu vollständig, werden zur Bindung des ausgetretenen Farbstoffes entsprechend größere Mengen resorbierter Blausäure oder Cyanide notwendig sein. In diesem Fall besteht die Möglichkeit, daß nicht die gesamte Menge des hämolysierten Blutfarb-

stoffs eine Bindung mit der Blausäure eingehen kann. Untersucht man, ohne die Trennung in intra- und extracellulär gelagerten Blutfarbstoff vorzunehmen, das Gesamtblut, so sind die Aussichten, in diesem Blut Cyanhämoglobin nachzuweisen, gering.

In 2 Fällen tödlich endender Blausäurevergiftung fanden wir bei spektroskopischer und spektrographischer Untersuchung im hämolysierten Gesamtblut (Serum + Blutkörperchen) stets die Extinktion des reinen Oxyhämoglobins. Einer dieser Fälle betraf einen 55jährigen Mann, der gemeinsam mit seiner Frau in den Tod gehen wollte. Beide tranken gegen Abend angeblich geringe Mengen in Wein gelöstes Cyankalium, dessen genaues Quantum nicht feststeht. Die Frau wurde gegen Morgen noch lebend angetroffen und durch Magenspülung und Herzmittel gerettet. Der Mann war während der Nacht verstorben. Er kam am 5. Tage zur Sektion: Blaurote Totenflecke, dunkelrotes flüssiges Blut, Hyperämie und geringe Blutaustritte in der Magenschleimhaut. Im frischen Quetschpräparat der Magenschleimhaut fanden sich bei mikroskopischer Untersuchung hellrote hyperämische Herde. Bei mikrospektroskopischer Betrachtung zeigte sich eine matte Verschattung in Mitte-Grün. Nach Reduktion mit Natriumhydrosulfit bildete sich das Spektrum des reduzierten Hämoglobins. Das Blut der Magenschleimhaut war demnach bereits in Cyanhämoglobin umgewandelt. Im Mageninhalt ließ sich mit der angegebenen Methode Blausäure als Cyanhämochromogen nachweisen. In 20 cem Leichenblut war diese Reaktion schwach positiv. *Schönbein*sche Guajakharzprobe positiv. Das Blutserum war bereits stark hämolytisch. Bei spektroskopischer Untersuchung fand sich zunächst reines Oxyhämoglobin. Nach 2 Tagen bei Zimmertemperatur Abnahme der Intensität des ersten und Zunahme und Verbreiterung des zweiten Schattens. Dieser Unterschied trat bei vergleichsweiser Betrachtung mit reduziertem und luftgeschüttelten Serumanteil deutlich hervor. Im Laufe der weiteren Beobachtung entstand kein reines Oxyhämoglobin. Der Inhalt der roten Blutkörperchen zeigte das Spektrum des reinen Oxyhämoglobins. Eine Umwandlung oder teilweise Umwandlung in Cyanhämoglobin trat im Laufe der weiteren Beobachtung nicht auf.

Das hämolytische Blutserum (Herzblut) wurde fünffach mit kaliumferri-cyanidhaltigem Wasser verdünnt und spektrographisch gemessen. Der Extinktionsverlauf ist in Abb. 5 Nr. 2 eingezeichnet. Bei spektroskopischer Untersuchung fand sich eine matte Verschattung im Rot und zwei intensivere matt konturierte Verdunkelungen im Grün. Der Inhalt der gewaschenen roten Blutkörperchen wurde unter gleichen Versuchsbedingungen spektrographisch untersucht. Als Vergleichslösung dienten jeweils eine wässrige Kaliumferricyanidlösung gleicher Konzentration. Die Extinktionskurve des Gesamtblutes ist in Abb. 5 Nr. 3 wiedergegeben. Sie deckt sich mit den Messungen von *Haurowitz* an Methämoglobin gleicher Pufferung und stimmt im Rahmen der Fehlergrenze mit den Messungen von cyanfreiem Kontrollblut überein. Verglichen mit dem Spektrum des hämolytischen Serums war die Verschattung im Rot, wie dies auch aus den Kurven hervorgeht, intensiver. Die Schatten im Grün traten dagegen weniger deutlich in Erscheinung. Durch den Schnittpunkt beider Kurven ist in Abb. 5 Nr. 1 der Extinktionsverlauf des Cyanhämoglobins eingezeichnet. Die Extinktion des hämolytischen Blutserums erweist sich als ein Mischspektrum aus Methämoglobin und Cyanhämoglobin, während der Farbstoff der hämolysierten roten Blutkörperchen den Extinktionsverlauf des reinen Methämoglobins wiedergibt. Aus diesen Messungen geht im weiteren hervor, daß der Blausäuregehalt des Blutes in solchen Vergiftungsfällen nur sehr gering zu sein braucht. Er ist nicht annähernd in der Lage, die Gesamtmenge des Blutfarbstoffes mit Cyan zu

sättigen. Die tödliche, fermentlähmende Wirkung der Blausäure und ihrer Salze tritt in Vergiftungsfällen anscheinend schon bei geringem Cyangehalt der Körpersäfte ein. Je geringer die Hämolyse, je aussichtsreicher ist hiernach der Versuch, im Blutserum eine vollständige Sättigung des hämolysierten Farbstoffes mit Blausäure als Cyanhämoglobin vorzunehmen.

Die Probe mit chlorsaurem Kalium ergab im hämolysischen Blutserum nach 48 Stunden eine fast wie Oxyhämoglobinlösung aussehende Flüssigkeit, die bei spektroskopischer Betrachtung das Cyanhämoglobinspektrum zeigte. Am Boden des Gefäßes hatte sich ein graurötlicher, flockiger Niederschlag abgesetzt. Der Inhalt der roten Blutkörperchen und das Gesamtblut zeigten nach Zusatz von chlorsaurem Kalium und Kaliumpermanganat eine weitgehende Zerstörung des Farbstoffes ohne erkennbares Cyanhämoglobinspektrum.

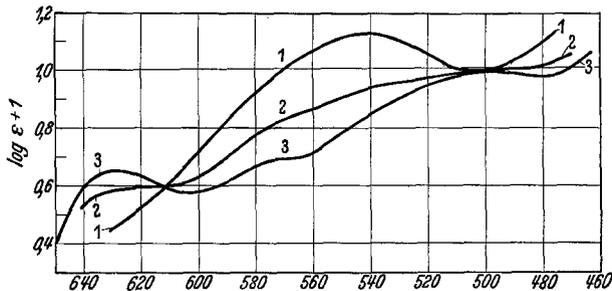


Abb. 5. Nr. 1: Cyanhämoglobin. — Nr. 2: Mischblut aus Cyanhämoglobin und Methämoglobin, dargestellt aus dem hämolysischen Blutserum einer Vergiftung mit KCN nach Zusatz von Ferricyankalium. — Nr. 3: Methämoglobin, dargestellt aus dem Inhalt gewaschener roter Blutkörperchen des gleichen Falles.

Zusammenfassung.

Bei cyanvergifteten Hunden ließ sich eine *nach dem Tode* eintretende zunehmende Bildung von Cyanhämoglobin im Blut feststellen. Bei Eisschranktemperatur entstand Cyanhämoglobin nach einigen Wochen, bei Zimmertemperatur nach einigen Tagen. Durch die reduzierende Wirkung der Fäulnisvorgänge wird das Cyanhämoglobin in reduziertes Hämoglobin überführt. Bei Sauerstoffzutritt entsteht wiederum das Cyanhämoglobin.

Das Verhalten des Cyanhämoglobins und Cyanhämatins gegen alkalische Puffergemische wird untersucht. Über den Nachweis von Cyanhämoglobin neben Oxyhämoglobin und Methämoglobin wird berichtet.

Bei Anwesenheit von Blausäure oder Cyaniden neben Serumeiweißstoffen oder Hydrazin bildet sich das diesem Mischungsverhältnis entsprechende Cyanhämochromogen bzw. Cyanhämatin. Die Extinktionswerte des Cyanhämins und Cyanhämochromogens werden angegeben. Die Darstellung von Cyanhämochromogen im Blut vergifteter Tiere ist bei dem reichlichen Überschuss an Serumeiweißkörper nicht möglich, dagegen gelingt es, die von vergifteten Leichenorganen aus-

gehende Blausäureentwicklung in einem Tropfen einer 0,2proz. reinen Häminlösung als Cyanhämochromogen nachzuweisen. Diese Cyanhämochromogenprobe wird spektroskopisch vorgenommen, sie ist spezifisch und sehr empfindlich.

Im Tierversuch führt eine Blausäurevergiftung nur zu einer extracellulär liegenden Cyanhämoglobinbildung. Im Inhalt der roten Blutkörperchen ließ sich keine durch spektrographische Methoden feststellbare Blausäureeinwirkung auf den Blutfarbstoff nachweisen. Im Reagensglase vermögen Alkalicyanide in gleicher Weise die Zellwand der roten Blutkörperchen nicht zu durchdringen. Von Methämoglobinbildnern zeigen Ferricyankalium, Natriumnitrit, chlorsaures Kalium und Kaliumpermanganat in ihrer Zelldurchlässigkeit *in vitro* ein verschiedenes Verhalten.

Bei tödlich endender Blausäurevergiftung konnte beim Menschen eine extracelluläre Cyanhämoglobinbildung nachgewiesen werden. Die im Serum vorgefundenen Blausäuremengen waren in den untersuchten Fällen gering. Die Resultate wurden durch spektrochemische Untersuchungen bestätigt.

Literaturverzeichnis.

- Anson* u. *Mirsky*, J. of Physiol. **60**, 50 (1925). — *Barcroft*, Die Atmungsfunktion des Blutes. Berlin 1929. — *Hawrowitz*, Hoppe-Seylers Z. **138**, 90 (1924); **169**, 235 (1927); **194**, 98 (1931); **232/33**, 159 (1935). — *Heilmeyer*, Medizinische Spektrophotometrie. Jena 1933. — *Meyer, R. M.*, Dtsch. Z. gerichtl. Med. **25**, 112 (1935). — *Mörner*, Hoppe-Seylers Z. **41**, 542 (1904) — Nord. med. Ark. Festband **1**, 26 (1897). — *Neureiter, F. v.*, Dtsch. Z. gerichtl. Med. **2**, 313 (1923). — *Preyer*, Die Blausäure. Bonn 1868 — Zbl. med. Wiss. **1867** — Virchows Arch. **40**, 125 (1867). — *Schmidt, O.*, Dtsch. Z. gerichtl. Med. **21**, H. 4, 334 (1933). — *Schrader*, Gilberts Analen d. Physik Halle **13**, 503—504. — Dtsch. Z. gerichtl. Med. **21**, 342 (1933). — *Schumm, O.*, Die spektrochemische Analyse natürlicher organischer Farbstoffe. Jena 1927. — *Sörensen*, Biochem. Z. **21** (1919). — *Vlès*, Bull. Soc. Chim. biol. Paris **2**, 223 (1920). — *Weigert*, Ber. dtsh. chem. Ges. **49** I, 1496 (1916). — *Wirth, W.*, u. *F. G. Lämmerhirt*, Biochem. Z. **270**, 455 (1934). — *von Zeynek*, Hoppe-Seylers Z. **33**, 426 (1901). — *Ziemke, E.*, Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden v. Abderhalden Abt. 4, Teil 12, H. 2.