

Aus dem Institut für Gerichtliche Medizin und Kriminalistik der Universität
Hamburg (Direktor: Prof. Dr. E. FRRITZ).

Die Umwandlung des Blutfarbstoffs in Porphyrin mittels Thioglykolsäure.

Ein Beitrag zum fluorometrischen Blutnachweis.

Von

GÜNTHER DOTZAUER und GÜNTHER KEDING.

Mit 3 Textabbildungen.

(Eingegangen am 1. November 1954.)

Das Fluoreszenzvermögen der Porphyrine wurde durch HELLER als Blutnachweis in die gerichtliche Medizin eingeführt.

Grundsätzlich erhält man aus Blut oder Blutfarbstoff Porphyrine durch Abspaltung des komplex-relativ fest-gebundenen Eisens. HOPPE-SEYLER konnte durch Zusatz von konz. Schwefelsäure die Eisenabspaltung erzielen und erhielt so das bisher in der Natur nicht aufgefundene Hämatorporphyrin. Aber auch mit anderen starken Säuren gelingt die Eisenabspaltung, wie in der Folgezeit gezeigt werden konnte (konz. HCl, H₃PO₄ oder Essigsäure bzw. Eisessig-Äther (PAPENDIECK, LIST)).

Der Nachteil des Arbeitens mit konzentrierten Säuren liegt auf der Hand; deshalb neutralisierte WAGENAAR sofort mit Ammoniak. Das im neutralen Bereich geringere Fluoreszenzvermögen der Porphyrine belastet jedoch dieses Verfahren. Wesentlich leichter gelingt die Eliminierung des Eisens des Tetrapyrrolgerüsts des Blutfarbstoffs nach vorheriger Reduktion, denn jetzt wird das Eisen schon bei geringerer H⁺-Ionenkonzentration abgespalten [Na-Amalgam (SCHUMM), Stannochlorid-HCl oder Stannochlorid in Eisessig-HCl (HAMSICK, PAPENDIECK, PAPENDIECK und BONATH), Hydrazinhydrat in Ameisensäure oder Eisessig bzw. in salzsäurehaltigem Alkohol (SCHUMM), Eisenpulver in Ameisensäure (FISCHER und PUTZER, HAMSICK), Bromwasserstoff-Eisessig (NENCKI und SIEBER)]. Jodwasserstoff-Eisessig und KOH (BRUGSCH), Salz-, Ameisen-, Essigsäuregemisch und Hydrazinhydrochlorid (BRUGSCH und WESTERS), Eisensulfatkristalle und kräftige Durchblasung mit Chlorwasserstoffgas (GRINSTEIN, ERIKSEN), Brenztraubensäure (PAUL).

Noch einfacher gelingt die Enteisenung durch Thiole (BARRON) bzw. Thioglykolsäure, worauf mich GAEDE¹ aufmerksam machte. Denn diese Säure besitzt wegen ihrer SH-Gruppe ein ausreichendes Reduktionsvermögen und ruft gleichzeitig die erforderliche, d. h. für die Fluoreszenzintensität optimale p_H-Verschiebung in den sauren Bereich hervor.

Die Anwendung dieses Verfahrens für den forensischen Blutnachweis ist einfach, geringste Spuren Mengen führen zu sicheren Ergebnissen.

Nach dem Resultat der *Voruntersuchungen* erschien für unsere Zwecke n/10HCl ein günstiges Lösungsmittel von Trockenblutspuren unterschiedlicher Herkunft

¹ Herrn Dr. K. GAEDE, Physiol.-Chem. Institut der Universität Hamburg, sei für den Hinweis herzlich gedankt.

und Behandlung zu sein. Die quantitative Fluorescenzmessung zweier Vergleichsreihen — ausgehend von einer 800 mg-%igen Hb-Lösung abfallend auf 10 mg-% — ergab eine durchschnittliche Überlegenheit des Ansatzes in $n/10$ HCl um 14% gegenüber dem in $n/10$ H_2SO_4 . Durch Vermeidung stärkerer HCl-Konzentrationen wird zudem eine Fluorescenzabnahme verhindert. SCHWARTZ und Mitarbeiter stellten fest, daß mit ansteigender Porphyrinkonzentration die Fluorescenzintensität bei stärkeren Säuren vergleichsweise abnahm.

Als Reduktionsmittel wurde Thioglykolsäure (Merck 0697 etwa 80% oder Bock, Hbg., etwa 98%) benutzt. Als günstigstes Verhältnis dieses flüssigen Reduktionsmittels zum Säurevolumen erwies sich 4:10. Der Gesamtansatz richtet sich zweckmäßigerweise nach der Menge des Untersuchungsblutes.

Ein Absorptionsversuch an dem Ansatz $n/10$ HCl und Thioglykolsäure im Bereich von 340—720 $m\mu$ ergab ein praktisch optisch leeres Spektrum. Damit wurde die zu fordernde Fluoreszenzlosigkeit der Lösung bei einer Primärstrahlung von 366 $m\mu$ nachgewiesen.

Untersuchungsgang.

Die Trockensubstanz wird in Spuren in $n/10$ HCl verbracht. Der Blutfarbstoff geht rasch in Lösung und wird in Hämatin verwandelt. Bei geringer Substanzmenge empfiehlt es sich, die Säure etwa 15 min einwirken zu lassen. Wärme erhöht die Löslichkeit und beschleunigt die Hämatinbildung. Durch Wirkung des zugesetzten Reduktionsmittels und Erwärmung bis zum Sieden für etwa 1 min gelingt die Eisenabspaltung, Porphyrin ist entstanden.

Die visuelle Betrachtung erfolgt nach Abkühlung im Strahlengang einer Hg-Lampe. Falls die siedendwarme Lösung sofort untersucht wird, ist die Fluorescenzintensität nicht so groß als nach Annahme der Raumtemperatur.

Die typischen Farbkurven dieser Untersuchungsgänge stellt Abb. 1 dar. Das Absorptionsmaximum des Porphyrins bei etwa 400 $m\mu$ mit der noch großen Lichtaufnahme bei 336 $m\mu$ bestätigt die Möglichkeit der Fluoreszenzauslösung mit einer Primärstrahlung von 366 $m\mu$. Die hohe relative Intensität des Hg-Lichtes auf dieser Bande ist für die Fluorescenzexcitation günstig.

Das Fluorescenzvermögen des Hämatoporphyrins ist vom p_H -Wert des Lösungsmittels abhängig. Nach FINK und HOERBURGER zeigt das Hämatoporphyrin um p_H 2,0 ein ausgesprochenes Fluorescenzmaximum; ein zweites niederes liegt bei p_H 6,5—7, während sich ein Minimum in der Gegend des Isoelektrischen Punktes befindet. Die Abb. 2 demonstriert optimale Fluorescenzintensitäten bei dem von uns gewählten Verfahren. p_H -Messungen mit der Glaselektrode einer Mischung $n/100$ HCl/Thioglykolsäure (10:4) zeigten einen Wert von 1,24. Wir befinden uns demnach in einem optimalen Untersuchungsbereich. Die Wasserstoffionenkonzentration kann aber nicht nur die Intensität, sondern auch die Farbe der Fluorescenz beeinflussen. Farbwandlungen sahen wir jedoch nicht.

Zur qualitativen und quantitativen Prüfung der Fluoreszenzfähigkeit wurden einerseits Reihen mit abgewogener pulverisierter Hb-Substanz und andererseits ebenfalls stufenförmige Verdünnungsreihen von frisch entnommenem Vollblut mit festgelegtem Hb-Gehalt angelegt

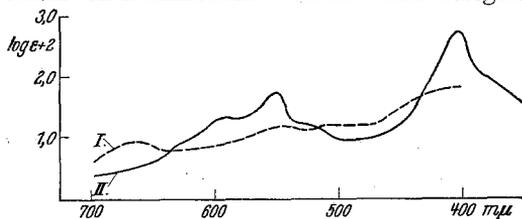


Abb. 1. Typische Farbkurven beider Untersuchungsschritte, aufgenommen mit dem Beckman-DU-Gerät. I Hämatin in n/10 HCl; II Hämatoporphyrin in n/10 HCl-Thioglykolsäure.

und Fluoreszenzmessungen vorgenommen. Als Meßgerät diente das Photometer Medeor-Eppendorf mit der Zusatzeinrichtung zur Fluoreszenzmessung gegen einen Fluoreszenzstandart, der gleich 100 % gesetzt wurde.

Die Sekundärstrahlung wurde sowohl unter Vorschaltung eines Filters GG 14 (Schott u. Gen.) als auch mit einem Filter RG 1 (Schott u. Gen.) gemessen. Filter GG 14 absorbiert Licht mit Wellenlängen kürzer als 500 mμ; für langwelligeres Licht besteht völlige Transparenz.

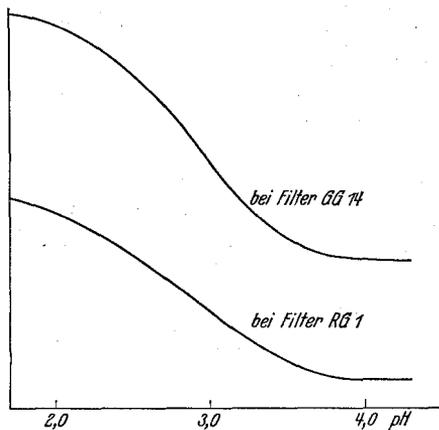


Abb. 2. Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit vom p_{H} .

RG 1 schaltet bei langwelliger Transparenz Licht von kürzerer Wellenlänge als 600 mμ aus. Der Vergleich ermöglicht einen Überblick über die spektrale Fluoreszenzlage des künstlich erzeugten Haematoporphyrins in quantitativer wie in qualitativer Beziehung.

Die Abb. 3 gibt zudem die Abhängigkeit der Fluoreszenz von der Menge des vorgelegten Hämoglobins wieder. Die Kurven entsprechen dem typischen Verhalten einer im sichtbaren Bereich absorbierenden fluoreszierenden Substanzlösung. Bei gleichblei-

bender Intensität der erregenden Strahlung (366 mμ) und konstanter Schichtdicke ($d = 1 \text{ cm}$) kommt es nach Überschreitung eines Schwellenwertes zum Anstieg der Fluoreszenz bis zur völligen Absorption der Primärstrahlung. Das spezifische Fluoreszenzvermögen des gelösten Stoffes nimmt bei weiterer Konzentrationszunahme ständig ab.

Eine Kontrolle der Fluoreszenzintensität und Farbe zwischen 15 und 25° C, also in weiten Schwankungen einer Raumtemperatur, zeigte keine merkliche Beeinflussung.

Photochemische Reaktionen traten innerhalb der üblichen Bestrahlungszeit nicht ein.

Zur Überprüfung der praktischen Verwendbarkeit wurden Trockenblutspuren verschiedensten Alters (bis zu 10 Jahren) sowie unter verschiedensten Bedingungen — Hitze, Feuchtigkeit, Fäulnis, Sonnenstrahlung — untersucht. Desgleichen wurde Blattgrün sowie Chlorophyll a und b getestet.

Die Chlorophyllproben waren eindeutig negativ, da Chlorophyllabkömmlinge erst bei höheren Säurekonzentrationen erfaßt werden. Teste von Farbstoffen und Untersuchungen verschiedenster Mate-

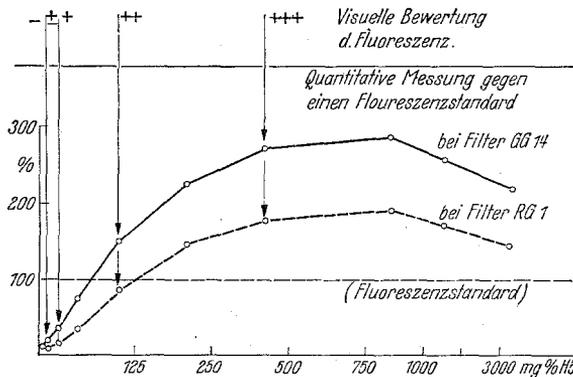


Abb. 3. Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der vorgelegten Hb- bzw. der entstehenden Porphyrinkonzentration.

rialien lieferten das gleiche Ergebnis. Andererseits konnte eine Rotfluoreszenz bei den getesteten Blutfarbstoffderivaten eindeutig erzeugt werden. Selbst wenn Blut verkohlt wurde und nur noch geringste Spuren unverkohlten Farbstoffs vorhanden waren, konnte ein sicherer Nachweis erbracht werden. Falls Hämatin vorliegt, kann es angezeigt sein, die Spur erst in einer $n/10$ Lauge zu lösen, um sie dann mit $n/10$ HCl aufzunehmen.

Da Galle, Stuhl, Mekonium das aus der Galle stammende Protoporphyrin oder Deutero-Mesoporphyrin enthalten, ist dieses Untersuchungsmaterial für den Blutnachweis über eine Phorphyrinfluoreszenz untauglich.

Zusammenfassung.

Aus Trockenblutspuren verschiedenster Herkunft und unterschiedlichstem Alter wurde künstlich Phorphyrin nach Enteisenung mit Säure und in Gegenwart eines starken Reduktionsmittels — Thioglykolsäure — erzeugt. Die Methode eignet sich ausgezeichnet zum Nachweis selbst

kleinster Blutmengen. Die Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität vom Lösungsmittel, der Substratkonzentration, dem p_{H} und der Temperatur wurde kontrolliert.

Literatur.

BARRON, E. S. G., Z. G. MILLER and G. KALNITZKY: The Oxydation of Dithiols. *Biochemic. J.* **41**, 62 (1947). — BRUGSCH, J.: Die Porphyrine. Leipzig: Johann Ambrosius Barth 1952. — BRUGSCH, J., u. G. WESTERS: Umwandlung der Stuhlhämine (Hämatine) in Porphyrine und ihre quantitative Bestimmung als Porphyrine. *Z. inn. Med.* **9**, 645 (1954). — ERIKSEN, L.: A simple Method for the Preparation of Protoporphyrin from washed Erythrocytes. *Scand. J. Clin. a. Labor. Invest.* **6**, 49 (1954). — FINK, H., u. W. HOERBURGER: Über die Ochronose der Schlacht-tiere. II. Identitätsbeweis mit Hilfe der p_{H} -Fluoreszenzkurven und durch Analyse. *Hoppe-Seylers Z.* **202**, 8 (1931). — FISCHER, H., u. S. PÜTZER: Zur Kenntnis der natürlichen Porphyrine. XIX. *Mitt. Hoppe-Seylers Z.* **154**, 17 (1926). — GRINSTEIN, M.: Studies of Protoporphyrin. *J. of Biol. Chem.* **167**, 515 (1947). — HAMSICK, A.: Über Porphyrin aus Oxyhaeminanhydrid. *Hoppe-Seylers Z.* **156**, 218 (1926). — Über Porphyrin aus Oxyhaeminanhydrid. II. *Mitt. Hoppe-Seylers Z.* **158**, 15, 16 (1926). — Zur Darstellung des Protoporphyrins. *Hoppe-Seylers Z.*, **180**, 308, 311 (1929). — Zur Krystallisation des Protoporphyrins. *Hoppe Seylers Z.*, **196**, 196 (1931). — HELLER, R.: Die Fluoreszenz der Haemoglobinderivate und ihre Bedeutung für den forensischen Blutnachweis. *Z. gerichtl. Med.* **51** (3), 219 (1916). — HOPPE-SEYLER, F.: *Med. u. Chem. Unters.* **4** (1871). *Zit. HOPPE-SEYLER-THIERFELDER, Handbuch der physiologisch und pathologisch-chemischen Analyse*, 9. Aufl. Berlin: Springer 1924. — LIST, P.: Über Porphyrinbildung aus Schwefelhaemoglobin. *Hoppe-Seylers Z.* **135**, 95 (1924). — NENCKI, M., u. N. SIEBER: Untersuchungen über den Blutfarbstoff. *Arch. exper. Path. u. Pharmakol.* **18**, 401 (1884). — Über das Haemin. *Arch. exper. Path. u. Pharmakol.* **20**, 325 (1886). — Über das Haematoporphyrin. *Arch. exper. Path. u. Pharmakol.* **24**, 430 (1888). — PAPENDIECK, A.: Über Porphyrin aus Blutfarbstoff. *Hoppe-Seylers Z.* **134**, 158 (1924). — Über Porphyrin aus Blutfarbstoff. III. *Mitt. Hoppe-Seylers Z.* **150**, 264 (1925). — Über Porphyrin aus Blutfarbstoff. IV. *Mitt. Hoppe-Seylers Z.* **152**, 215 (1926). — PAPENDIECK, A., u. K. BONATH: Über Porphyrin aus Blutfarbstoff. *Hoppe-Seylers Z.* **144**, 60 (1925). — PAUL, K.-G.: The Conversion of Ferri-porphyrins (Hemins) to their corresponding Porphyrins by means of Pyruvic Acid. *Acta chem. scand. (Copenh.)* **4**, 1221 (1950). — SCHUMM, O.: Über Porphyrin aus Blutfarbstoff. I. *Mitt. Hoppe-Seylers Z.* **132**, 34 (1924). — Über Porphyrin aus Blutfarbstoff. II. *Mitt. Hoppe-Seylers Z.* **139**, 34 (1924). — SCHWARZT, S., L. ZIEVE u. C. J. WATSON: An improved method for the determination of urinary coproporphyrin and an evaluation of factors influencing the analysis. *J. Labor. a. Clin. Med.* **37**, 843 (1951). — WAGENAAR, M.: Beiträge zur mikroskopischen, mikrospektroskopischen und quantitativen Blutuntersuchung. *Z. analyt. Chem.* **79**, 101 (1930).

DANCKWORTH, P. W.: *Lumineszenzanalyse*, 4. Aufl. Leipzig: Akademische Verlagsgesellschaft 1940. — DHÉRE, CH.: In *ABDERHALDENS Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden*, Abtl. II, Physikalische Methoden, Teil 3/1, S. 3097. Berlin u. Wien: Urban & Schwarzenberg 1934. — DHÉRE, CH., in *Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe*, Bd. II, S. 301. Wien: Springer 1939.

Privatdozent Dr. G. DOTZAUER, Hamburg 13, Harvestehuder Weg 10.