

Die Anwendung der Chemilumineszenz des Luminols in der gerichtlichen Medizin und Toxikologie

II. Die Wirkung des fetalen Blutes auf die Luminolreaktion*

K. WEBER, V. PALMOVIĆ, P. SPASIĆ und J. BASTIĆ

Institut für gerichtliche Medizin und Kriminalistik der Medizinischen Fakultät
Institut für medizinische Forschung und Arbeitsmedizin
der Jugoslawischen Akademie der Wissenschaften in Zagreb

Eingegangen am 8. April 1968

In früheren Arbeiten (WEBER, 1966; WEBER und MIKULIČIĆ, 1959) wurde festgestellt, daß bei der Chemilumineszenz des Luminols (3-Aminophthalhydrazid), die durch Hämoglobin hervorgerufen wird, nicht das reduzierte Hämoglobin oder das Oxyhämoglobin, auf die Luminolreaktion wirkt, sondern nur das Methämoglobin. Das sich allerdings, insofern es in der verwendeten Blutlösung nicht oder nicht in genügender Konzentration vorhanden ist, je nach der verwendeten Reagenslösung mehr oder weniger rasch aus dem Hämoglobin bildet. Die Bildungsgeschwindigkeit des Methämoboglobins im Reaktionsgemisch spielt also bei der Chemilumineszenz des Luminols, die durch Blutlösungen hervorgerufen wird, eine wesentliche Rolle. Dabei ist aber weiterhin noch zu beachten, daß sich die Luminolreaktion in alkalischen Lösungen (pH = 11 bis 12,5) abspielt und demzufolge eine Denaturierung des Hämoglobins mit Hämatinbildung im Verlauf der Reaktion auch in Frage kommt. Es könnte also auch das Hämatin — gleichfalls ein Komplex mit dreiwertigem Eisen — die Chemilumineszenz des Luminols aktivieren und in diesem Falle würde die Denaturierungsgeschwindigkeit des Hämoglobins eine Rolle spielen.

Andererseits wird allgemein angenommen (vgl. z. B. SCHWERD, 1962), daß dem Hb-F des fetalen Blutes in den Blutzellen eine leichtere Oxydierbarkeit zukommt als dem Hb-A des Erwachsenenblutes, was besonders bei Vergiftungen mit Methämoglobinbildnern zum Ausdruck kommt (LECKS, 1950; LECKS und WOLMAN, 1950; BETKE, 1959; BETKE und KLEIHAUER, 1957; BETKE und SCHOLZ, 1958 u.a.). Es besteht aber auch ein wesentlicher Unterschied zwischen den beiden Hämoglobintypen bezüglich ihres Alkalidenaturierungsgrades (BRINKMAN und JONXIS, 1935; BEAVEN, ELLIS und WHITE, 1960 u.a.), was bei ihrer Wirkung auf die Chemilumineszenz des Luminols gleichfalls beträchtliche Unterschiede bedingen kann.

* I. Mitt. vgl. Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med. 57, 410 (1966).

Verbindet man die angeführten bekannten Tatsachen und Annahmen, so kann man leicht folgern, daß es möglich sein muß, Reaktionsbedingungen für die Luminolreaktion zu finden, die einen wesentlichen Unterschied in der Wirksamkeit des fetalen Blutes im Vergleich zur Wirkung des Blutes erwachsener Menschen aufweisen werden. Wir haben diese Voraussetzungen tatsächlich bestätigen können und gefunden, daß man mit Hilfe der Chemilumineszenz verläßlich fetales Blut (Hb-F) vom Blut erwachsener Menschen (Hb-A) unterscheiden kann.

Die Versuchsmethode

Die erste Versuchsreihe, mit je über 40 Proben von fetalem Blut und Erwachsenenblut, wurde mit dem Luminolreagens mit Natriumcarbonat und größerer Wasserstoffperoxydkonzentration durchgeführt. Die Ansätze waren:

- 32 ml H₂O
- 5 ml 0,4 n Na₂CO₃ in H₂O
- 5 ml 1,76 M H₂O₂
- 5 ml $4 \cdot 10^{-3}$ M Luminol in $5 \cdot 10^{-2}$ M Na₂CO₃

Dieses Reagens wirkt bei kleinerer Alkalinität (pH = 11) stark oxydierend, aber verursacht eine schwächere Alkalidenaturierung des Hämoglobins. Die zweite Versuchsreihe haben wir, gleichfalls mit je 40 Blutproben, mit dem normalen Luminolreagens mit Natronlauge vorgenommen. Dieses Reagens (pH = 12,5) bestand aus:

- 32 ml H₂O
- 5 ml 0,4 n NaOH in H₂O
- 5 ml 0,175 M H₂O₂
- 5 ml $4 \cdot 10^{-3}$ M Luminol in $5 \cdot 10^{-2}$ M NaOH in H₂O

(vgl. auch die I. Mitteilung, WEBER, 1966). Den Reagenslösungen wurde beim Versuch 3 ml Blutlösung 1:2000 hinzugefügt, das Gemisch durchgerührt und der zeitliche Verlauf der Lumineszenzintensität photoelektrisch mit dem Kompensationsschreiber registriert. Da das Reagens mit NaOH eine sehr intensive Lumineszenz ergibt, mußte mit der kleinsten Empfindlichkeit der Meßapparatur gearbeitet werden und auch diese mußte noch auf optischem Wege durch Auflegen von Papierblättern, die für das Lumineszenzlicht etwa halbdurchlässig sind, herabgesetzt werden. Man kann, je nach der Empfindlichkeit des Schreibers und der Intensität der Lumineszenz, ein oder mehrere solche Papierblätter (Durchschlagspapiere für die Schreibmaschine) direkt auf die Stirnfläche der Photozelle auflegen. Da es sich gewöhnlich um relative Vergleichsmessungen handelt, im konkreten Falle um den Vergleich der Wirkung von Hb-A und Hb-F unter gleichen Versuchsbedingungen, erübrigt sich die Kenntnis von absoluten Empfindlichkeitswerten.

Für die Proben von Erwachsenenblut diente frisches Blut von gesunden erwachsenen Menschen beider Geschlechter, sowie auch Leichenblut, das nach Möglichkeit flüssig war und besonders keiner vorherigen wesentlichen Veränderung, etwa durch Blutgifte, ausgesetzt war. Auch mit gewaschenen und hämolysierten roten Blutkörperchen wurde gearbeitet. Als Proben von fetalem Blut wurde Nabelschnurblut normaler Geburten aus der hiesigen Geburtsklinik, sowie Leichenblut der Feten von Fehlgeburten, Frühgeburten u.ä. verwendet. Die Blutproben wurden absichtlich wahllos genommen, um entsprechende Mittelwerte der Lumineszenzmessungen zu erhalten. Es handelte sich also zunächst darum Unterschiede in der Wirkung von Blut ohne Hb-F einerseits und von Blut mit größerer Hb-F Konzentration andererseits summarisch festzustellen.

Die für die Versuche verwendeten Blutlösungen hatten immer genau eine Hämoglobinkonzentration von 0,0075 g in 100 ml, was einer Verdünnung von 1:2000 des normalen Blutes mit 15 g Hb in 100 ml Blut entspricht. Zur Herstellung solcher Blutlösungen wurde zuerst 1 ml des originalen Blutes mit 19 ml H₂O vermischt. War die Lösung trübe, so wurde sie filtriert oder zentrifugiert. Ein Teil der so erhaltenen klaren Blutlösung 1:20 wurde zur spektrophotometrischen Bestimmung der Extinktion (E) für die Wellenlänge von 560 nm und die Schichtdicke von 0,2 cm verwendet: $E_{560}^{0,2}$. Für eine genau 0,75%ige Oxyhämoglobinlösung (Blutlösung 1:20) beträgt diese Extinktion: $E_{560}^{0,2} = 0,790$ und durch Verdünnung von 1 ml solcher Blutlösung zu 100 ml erhält man eine genaue Blutlösung 1:2000. Ist die gemessene Extinktion kleiner oder größer, so erhält man die Menge (a) in ml der Blutlösung 1:20, die zu 100 ml verdünnt werden muß um eine genau 0,0075%ige Lösung zu erhalten aus der Beziehung: $\frac{0,790}{E_{560}^{0,2}} = a$.

Solche Blutlösungen 1:2000 enthalten das Hämoglobin fast ausschließlich in der Form von Oxyhämoglobin, insofern sich nicht durch frühere Oxydationsprozesse im unverdünnten Blut etwas Methämoglobin gebildet hat. Die neutralen wässrigen Blutlösungen 1:2000 sind bei Zimmertemperatur gut einige Stunden haltbar, ohne nennenswerter Bildung von Methämoglobin. Dies gilt sowohl für Hb-A als auch für Hb-F in der Lösung.

Die Versuchsergebnisse

Die Ergebnisse der ersten Versuchsreihe mit dem Carbonatreagens des Luminols haben klar gezeigt, daß in diesem Reagens offenbar die Oxydation des Hb-F zu Methämoglobin oder Hämatin *nicht* rascher erfolgt als die des Hb-A. Im Gegenteil, eine solche Oxydation geht langsamer vor sich, wodurch nur kleinere Intensitäten und Lichtsummen der Chemilumineszenz des Luminols erreicht werden. Dies wurde bei allen Parallelversuchen mit fetalem Blut und Erwachsenenblut festgestellt. Als charakteristisches Beispiel zeigt die Abb. 1 solche Intensität-Zeitkurven ($\Phi - t$), die mit fetalem Blut (F) und Erwachsenenblut (A) erhalten wurden. Das fetale Blut ergab immer einen höheren Wert für die maximale Intensität (Φ_m) der Chemilumineszenz ($\Phi_m = 72$, nach Abb. 1) als das Erwachsenenblut ($\Phi_m = 52$, nach Abb. 1). Diese Werte werden nach unserer Auffassung durch das Methämoglobin verursacht, das in den Originalblutproben bereits vor der Bearbeitung (Verdünnung) vorhanden war. Diese geringen „physiologischen“ Methämoglobinkonzentrationen, die größenordnungsmäßig unter 1% liegen, sind also im fetalen Blut größer als im Erwachsenenblut. Der abfallende Ast der Intensität-Zeitkurven (linker Ast der Kurven der Abb. 1) entspricht der Umwandlung des Hämoglobins (Oxyhämoglobins) in Methämoglobin, und die Intensitätswerte dieses Kurvenastes fallen bei den Versuchen mit fetalem Blut zeitlich wesentlich rascher ab als die entsprechenden Werte bei den Versuchen mit Erwachsenenblut. Dies bedeutet aber, daß das Hb-F langsamer und in quantitativer Beziehung in geringerem Ausmaß zu Methämoglobin oder Hämatin oxydiert wird als das Hb-A. Dadurch

wird aber auch eine wesentlich kleinere Lichtsumme (L), also eine kleinere Gesamtausstrahlung der Chemilumineszenz bei den Versuchen mit fetalem Blut ($L=295$, nach Abb. 1) als bei den Versuchen mit Erwachsenenblut ($L=820$, nach Abb. 1) verursacht. Die besprochenen Unterschiede in der Kurvenform und den Werten der Lichtsumme können wohl zur Unterscheidung des fetalen Blutes vom Erwachsenenblut mit Hilfe der Luminolreaktion herangezogen werden.

Solche Unterschiede konnten wir auch in einem Fall von Tod durch Elektrizitätswirkung instruktiv feststellen. Eine 21jährige gesunde Frau, die im 9. Monat schwanger war, verunglückte tödlich beim zufälligen Berühren einer freien elektrischen Leitung, die unter 220 Volt Spannung stand. Bei der Obduktion wurden Blutproben aus einem Blutgefäß der Mutter sowie auch des Feten entnommen und zu Versuchen mit der Luminolreaktion verwendet. Es handelte sich also um zusammengehörige Blutproben mit Hb-A bzw. Hb-F. Es ergaben sich bei den Versuchen mit dem Carbonatreagens des Luminols für die maximale Lumineszenzintensität (Φ_m) und die Lichtsumme (L) diese Werte:

	Φ_m	L
Blut der Mutter	52,5	1535
Blut des Feten	69,2	407

Der Unterschied in den Werten der Lichtsumme erscheint bei diesem Versuch besonders charakteristisch.

In der zweiten Versuchsreihe dieser Arbeit, mit dem Luminolreagens mit NaOH, wurde festgestellt, daß das fetale Blut unter gleichen Versuchsbedingungen eine wesentlich niedrigere maximale Lumineszenzintensität (Φ_m) ergibt als das Erwachsenenblut, während die Lichtsummen (L) nicht sehr verschieden sind. Die Abb. 2 zeigt zwei charakteristische Intensität-Zeitkurven ($\Phi-t$) dieser Versuchsreihe. Es ist ersichtlich, daß das fetale Blut (F) eine wesentlich schwächere Chemilumineszenz längerer Dauer hervorruft als das Erwachsenenblut (A).

Die Werte der maximalen Lumineszenzintensität (Φ_m) von je 40 Bestimmungen dieser Art wurden statistisch gewertet, wobei für die arithmetischen Mittelwerte ($\bar{\Phi}_m$) und die mittleren Abweichungen (σ) der Bestimmungen Zahlenwerte erhalten wurden, die in der Tabelle ver-

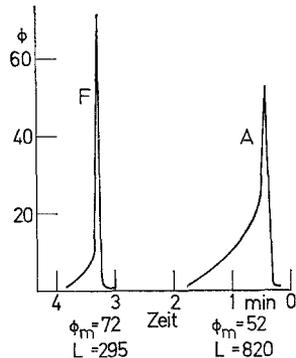


Abb. 1. Intensität-Zeitkurve der Chemilumineszenz bei Anwesenheit von fetalem Blut (F) und Erwachsenenblut (A). Luminolreagens mit Na_2CO_3 · Φ relative Lumineszenzintensität, t Reaktionszeit, Φ_m maximale Lumineszenzintensität, L Lichtsumme

zeichnet sind. Es ist ersichtlich, daß der arithmetische Mittelwert der Lumineszenzintensität für Erwachsenenblut mehr als zweimal höher ist als der entsprechende Wert für fetales Blut. Die mittleren Abweichungen sind aber gering. Die Zuverlässigkeit der Bestimmungen wurde mit Hilfe des t -Testes geprüft, und der erhaltene Wert ($t=37,7$) spricht für eine sehr hohe Zuverlässigkeit der Bestimmungsmethode.

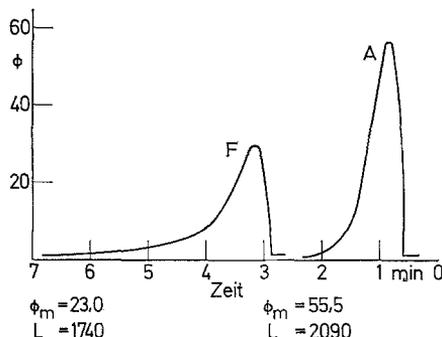


Abb. 2. Intensität-Zeitkurven der Chemilumineszenz bei Anwesenheit von fetalem Blut (F) und Erwachsenenblut (A). Luminolreagens mit NaOH

Tabelle. *Luminolreagens mit NaOH*

Blutart	$\bar{\Phi}_m$	σ	t
	arithmetisches Mittel	mittlere Abweichung	
Fetales Blut	23,6	3,71	37,7
Erwachsenenblut	54,5	3,62	

Betrachtet man die angeführten Versuchsergebnisse, so kann man feststellen, daß sich beide Methoden (Carbonat- als auch NaOH-Reagens) zur Unterscheidung des fetalen Blutes vom Erwachsenenblut eignen. Die Ergebnisse sind besonders sicher, wenn man gleichzeitig mit dem Versuch mit der fraglichen Blutart auch noch einen Versuch mit Erwachsenenblut bekannter Herkunft durchführt. Dies erübrigt sich, wenn man die Meßapparatur und die Reagenzien gründlich auf die beiden Blutarten geeicht hat. Es ist anzunehmen, daß die zweite Arbeitsweise, mit dem Luminolreagens mit NaOH, verlässlicher ist, und es besteht die Möglichkeit, sie zu einer quantitativen Bestimmungsmethode der Konzentration von Hb-F in Blutproben auszubauen.

Besprechung der Versuchsergebnisse

Den angeführten Versuchsergebnissen kommt auch eine bestimmte theoretische Bedeutung zu. Zunächst ist festzustellen, daß das fetale

Hämoglobin, das sich *in vivo* bei der Einwirkung von Methämoglobinbildnern leicht in Methämoglobin verwandelt, bei den Versuchen *in vitro* mit den Reagenzien der Luminolreaktion ein entgegengesetztes Verhalten aufweist. Es wird in den Luminolreagenzien schwerer zu Methämoglobin oder Hämatin oxydiert als das Hb-A. Diese Feststellung ist auch deshalb merkwürdig und wichtig, weil bekannt ist (BETKE, 1954; BETKE und SCHOLZ, 1958; BETKE und KLEIHAUER, 1957), daß Hb-F auch *in vitro* durch Kaliumferricyanid und durch Natriumnitrit rascher in Methämoglobin umgewandelt wird als Hb-A. Um diese Eigenschaften der genannten Hämoglobintypen zu verstehen, ist zu beachten, daß die Luminolreagenzien eine stark alkalische Reaktion aufweisen (pH = 11 und 12,5). Es ist deshalb anzunehmen, daß bei der Wechselwirkung der Hämoglobine mit diesen Reagenzien die Alkali-Denaturierungsgeschwindigkeit eine sehr große Rolle spielt. Hb-F ist wesentlich schwerer denaturierbar als Hb-A. Es bildet also in den alkalischen Lösungen der Luminolreagenzien langsamer durch Abspaltung des Globins das freie Häm, dann das Hämatin und schließlich vielleicht das entsprechende Hämichrom. Die letzteren Komplexe mit dem dreiwertigen Eisen sind aber, nebst dem Methämoglobin, jene Verbindungen, die die Luminolreaktion zu aktivieren vermögen.

In diesem Sinne möchten wir die Intensität-Zeitkurven der Chemilumineszenz des Luminols, die durch Hb-F aktiviert wird, mit der Denaturierungsgeschwindigkeit des Hb-F in Zusammenhang bringen. Die besprochenen Lumineszenzversuche stellen dann aber eigentlich eine besondere Modifikation der Versuche über die Alkalidenaturierung des Hb-F dar, wobei die Chemilumineszenz nur als sehr geeigneter Anzeiger der Denaturierungsgeschwindigkeit dient. Es ist noch darauf hinzuweisen, daß bei diesen Versuchen tatsächlich nur die Eigenschaften der Hb-Moleküle zum Ausdruck kommen, da bei Blutverdünnungen 1:2000 alle übrigen Komponenten des Blutes in so kleinen Konzentrationen vorhanden sind, daß sie keinerlei nennenswerte Einflüsse auf die Chemilumineszenz haben können.

Zusammenfassung

Es wurden zwei Modifikationen für die Ausführung der Luminolreaktion angegeben, die es ermöglichen, durch photoelektrische Registrierung der Chemilumineszenzintensität in Abhängigkeit von der Reaktionszeit fetales Blut von Erwachsenenblut zu unterscheiden. Die Blutarten dienen dabei als Aktivatoren der Chemilumineszenz des Luminols. Durch statistische Bewertung der Versuchsergebnisse wurde festgestellt, daß dem Luminolreagens mit NaOH für die Unterscheidung des Hb-F vom Hb-A eine hochgradige Zuverlässigkeit zukommt. Das

spezifische Verhalten des fetalen Blutes bei der Aktivierung der Luminolreaktion wird mit der Geschwindigkeit der Alkali-Denaturierung des Hb-F in Zusammenhang gebracht.

Summary

Two modified procedures of effect the chemiluminescence of luminol (3-aminophthalhydrazide) are described which allow the distinction of fetal from adult blood by photoelectric recording of chemiluminescence intensity depending on the reaction time. Solutions of both kinds of blood (hemoglobin) act as activators of the reactions on which the chemiluminescence reaction is based. The statistical elaboration of the results (test with 40 blood samples of either kind) showed that the method of distinguishing Hb-F from Hb-A with a luminol reagent in the presence of sodium hydroxide is of high significance. The specific behaviour of fetal blood in the activation of the luminol reaction is obviously connected with the slow speed of fetal hemoglobin denaturation because of the influence of alkalis. These tests are in fact a new variant of observing the denaturation of hemoglobin with chemiluminescence assuming the role of detector.

Literatur

- BEAVEN, G. H., J. ELLIS, and J. C. WHITE: Estimation of small proportions of foetal haemoglobin in blood. *Nature (Lond.)* **178**, 857 (1956).
- BETKE, K.: Das fetale Hämoglobin (Hb-F). *Blut* **5**, 137 (1959).
- Die biologischen Eigenschaften des fetalen Blutfarbstoffes und ihre klinische Bedeutung. *Mshr. Kinderheilk.* **102**, 102 (1954).
- , u. E. KLEIHAUER: Nitrathaltiges Leitungswasser als Ursache einer Methämoglobinämie. *Dtsch. med. Wschr.* **82**, 1127 (1957).
- , u. P. SCHOLZ: Vergleichende Untersuchungen der Oxydation von Oxyhämoglobin Neugeborener und Erwachsener. *Naturwissenschaften* **45**, 88 (1958).
- BRINKMAN, R., and J. H. P. JONXIS: *Zit. nach SCHWERD*, 1962, S. 48.
- LECKS, H. J.: Methemoglobinemia in infancy. *Amer. J. Dis. Child.* **79**, 117 (1950).
- , and I. J. WOLMAN: Fetal hemoglobin in the human. *Amer. J. med. Sci.* **219**, 684 (1950).
- SCHWERD, W.: *Der rote Blutfarbstoff und seine wichtigsten Derivate*, S. 21. Lübeck: Max Schmidt-Römhild 1962.
- WEBER, K.: Die Anwendung der Chemiluminescenz des Luminols in der gerichtlichen Medizin und Toxikologie. I. Der Nachweis von Blutspuren. *Diese Z.* **57**, 410 (1966).
- , u. V. MIKULIČIĆ: Der Blutnachweis mit der Luminolreaktion (kroatisch) *Arh. Hig. Rada* **10**, 101 (1959).

Prof. Dr. K. WEBER,
 Prof. Dr. V. PALMOVIĆ,
 Dr. P. SPASIĆ und Dr. I. BASTIĆ
 Zagreb, Šalata 11