

Blutfarbstoffnachweis mit der Porphyrinprobe*

Wolfgang Schwerd

Institut für Rechtsmedizin der Universität Würzburg, Versbacher Landstraße 3, D-8700 Würzburg
Bundesrepublik Deutschland

Demonstration of Hemoglobin Using the Porphyrin Test

Summary. The demonstration of hemoglobin after its transformation into Porphyrin is specific and extremely sensitive. It is possible to detect amounts as small as a microgram. The use of sulphuric acid as a reagent is superior to the hydrochloric-thioglycol acid method. After obtaining a specimen from a blood stain (usually through soaking) it is recommended that it be concentrated by allowing the specimen once again to dry out. Prejudicial effects due to the extreme sensitivity of this test are therefore avoided.

Zusammenfassung. Der Nachweis des roten Blutfarbstoffs nach Umwandlung in Porphyrin ist spezifisch und äußerst empfindlich. Man kann noch Hämoglobinemengen im Mikrogrammbereich erfassen. Die Anwendung von Schwefelsäure als Reagenz ist der Salzsäure-Thioglykolsäure-Modifikation überlegen. In der forensischen Praxis empfiehlt es sich, die Methode nach Herauslösen der Blutspur aus dem Spurenlager und Wiederanreicherung durch Antrocknen durchzuführen. Dadurch sind nachteilige, die Empfindlichkeit der Methode beeinträchtigende Effekte weitgehend vermeidbar.

Key words. Blutfarbstoffnachweis – Porphyrinprobe, Blutfarbstoffnachweis – Spurenkunde, Blutfarbstoffnachweis

Beim Blutspurennachweis unterscheidet man bekanntlich Vorproben und Beweisproben. *Vorproben* (z.B. die Benzidinprobe oder bei der Untersuchung von größeren Flächen das Absprühen mit dem Luminol-Reagenz) sollte man nur dann anwenden, wenn mit freiem Auge keine Blutspuren erkennbar sind, weil bei sehr geringen Spurenmengen

1. dann, wenn Material zur Anwendung der Vorprobe in irgendeiner Form entnommen wird, ein unnötiger Verlust an Substanz eintritt und
2. bei direkter Anwendung des Reagenzes (Sprühreagenz) gerade bei sehr geringen Spuren mit Veränderungen zu rechnen ist, durch die weitere Untersuchungen gestört werden können (Schwerd u. Birkenberger).

* Herrn Professor Dr. W. Krauland, Berlin, zum 65. Geburtstag gewidmet

Unter den *Beweisproben* findet die *Porphyrinprobe* (auch Fluoreszenzprobe genannt) in den Lehrbüchern der Rechts- bzw. gerichtlichen Medizin nicht den ihr gebührenden Platz oder wird überhaupt nicht erwähnt, obwohl sie an Zuverlässigkeit den anderen Verfahren (Kristallisationsproben, spektroskopischer Nachweis etc.) gleichkommt, an Empfindlichkeit und Einfachheit sie alle übertrifft.

Die Nachweisbarkeit von Blutfarbstoff nach Überführung in Porphyrin ist lange bekannt, aber erst Heller hat 1916 auf die außerordentliche Verfeinerung dieses Blutspurennachweises durch Beobachtung im ultravioletten Licht hingewiesen. Dadurch sind noch mikroskopisch kleine Blutmengen erkennbar.

Der Reaktion liegt die von Hoppe-Seyler 1880 entdeckte Umwandlung des Hämoglobins in Hämatoporphyrin durch Zugabe von Schwefelsäure zugrunde. Da als Reaktionsprodukt Hämatoporphyrin nachgewiesen wird, eignet sich die Probe auch dann noch, wenn der rote Blutfarbstoff durch Fäulnis oder andere Einflüsse verändert ist. Solange der Hämring noch erhalten ist, wird die Reaktion positiv.

Methodik

Die Methode ist denkbar einfach: Man versetzt die Spur nach vorheriger Kontrolle im filtrierten ultravioletten Licht einer Analysen-Quarzlampe (366 nm) mit einem Tropfen konzentrierter Schwefelsäure und erkennt beim Vorhandensein von Hämoglobin und seinen Derivaten eine sofortige leuchtendrote Fluoreszenz. Die Vorkontrolle im UV-Licht ist notwendig, um präformiertes Porphyrin oder eine andere eventuell störende Fluoreszenz festzustellen.

Da Schwefelsäure sehr aggressiv ist, empfahl Wagenaar auf den verdächtigen Fleck mit einer Platinnadel etwas Schwefelsäure aufzutragen und die Säure sofort danach mit Ammoniak zu neutralisieren.

Wir halten es für besser, die Schwefelsäure nicht auf den Spureträger direkt aufzubringen. Wenn immer möglich, sollte man eine geringe Menge von dem angetrockneten Material abkratzen und sie auf ein Uhrglasschälchen (das im UV-Licht keine Eigenfluoreszenz haben darf) aufbringen. Eine Substanzmenge von etwa 1 mg ist völlig ausreichend.

Anhand von Verdünnungsreihen haben wir festgestellt, daß man noch etwa 0,6 µg Hb nachweisen kann. Diese Methode zählt somit zu den empfindlichsten Blutnachweismethoden überhaupt. Eine weitere „beträchtliche“ Zunahme der Rot-Fluoreszenz nach Zugabe von Ammoniak bis zur alkalischen Reaktion, auf die Danckwört hinwies, konnten wir bei der von uns gewählten „Tüpfel“-Methode nicht beobachten. Es tritt vielmehr das beim Zusammenbringen von konzentrierter Schwefelsäure und konzentriertem Ammoniak auftretende „Verpuffen“ störend in Erscheinung.

Spezifität der Methode und Störeinflüsse

Wenn man die bereits erwähnte Vorkontrolle der zu untersuchenden Spur im filtrierten UV-Licht nicht außer Acht läßt, so besteht keine Gefahr einer „Fehldiagnose“. *Eine nach Schwefelsäurezugabe auftretende Rot-Fluoreszenz beweist das Vorhandensein von Hämoglobin oder seinen Derivaten.* Wir haben in mehr als 20 Jahren, in denen wir mit der Methode arbeiten, niemals den Verdacht der *Vortäuschung* einer positiven Reaktion (Rot-Fluoreszenz nach Schwefelsäurezugabe) bekommen. Sollte er jedoch wirklich einmal auftreten, so kann man auf spektroskopischem Wege (Hämochromreaktion) oder durch Anwendung einer Kristallisationsreaktion eine Klärung herbeiführen.

Die in der Literatur erwähnte Gefahr, daß Kotspuren mit Blut verwechselt werden, besteht nicht, es sei denn, sie sind bluthaltig. Kot zeigt im Gegensatz zu Blut, das unbehandelt im UV-Licht infolge der hohen Lichtabsorption dunkel bis schwarz erscheint,

meist eine gelbliche Fluoreszenz. Der Eigen-, „Porphyrin“-Gehalt des Kots tritt in der Regel nicht als Rot-Fluoreszenz in Erscheinung. Es würde im übrigen im konkreten Fall bei der „Vorkontrolle“ auffallen.

Wenn es nicht gelingt, von der Spur Material abzunehmen, ohne auch Trägermaterial mitzubekommen, so besteht die Gefahr, daß dadurch die Reaktion beeinträchtigt wird. Organische Substanzen können zu einer Abschwächung und – bei sehr geringen Blutfarbstoffmengen – zu einer vollständigen Verhinderung der Reaktion führen. Bei verschiedenen Materialien, besonders bei gefärbten Stoffen können nach Zugabe von Schwefelsäure auch störende, meist gelbliche Eigenfluoreszenzen auftreten oder bereits vorbestehen.

Dieser Mangel läßt sich durch Herauslösen des Blutes aus der Spur meist beheben. Da das Blut in der Regel zu weiteren Untersuchungen (immunologischer Eiweißnachweis, Nachweis von Blutgruppensubstanzen oder anderen erblichen Blutmerkmalen) aus dem Trägermaterial herausgelöst werden muß, kann man eine kleine Menge des Eluats für die *Porphyrinprobe* abzweigen. Kontrollproben von unverdächtigen Stellen werden – wie üblich – mitangesezt.

Ein kleiner Tropfen des Eluats wird auf ein Uhrglas oder in das Näpfchen eines Hohlsliffobjektträgers gebracht, auf der Wärmeplatte oder im Luftstrom *angetrocknet* und im filtrierte UV-Licht der Analysen-Quarzlampe mit einem Tropfen konzentrierter Schwefelsäure versetzt. Durch das vorherige Antrocknen der Spur wird die Methode erheblich verfeinert, d.h. es lassen sich wesentlich geringere Hb-Mengen noch nachweisen als bei Zugabe der Säure zum flüssigen Eluat.

In Versuchsreihen haben wir geprüft, ob das Ammoniak-Eluat, das bei der Absorptions-Elutions-Methode (Kind) zum Blutgruppennachweis benötigt wird, auch für die Porphyrinprobe geeignet ist. Wir haben gleichgroße, auf Leinenläppchen angetrocknete Blutstropfen einerseits mit physiologischer Kochsalzlösung, andererseits mit 5%igem Ammoniak herausgelöst (Elutionszeit 1 Stunde). Bei frischen und wenige Tage alten Blutspuren war kein wesentlicher Unterschied zu erkennen. Bereits nach einigen Wochen zeigte sich jedoch eine deutliche Überlegenheit des Ammoniak-Eluats. Die in Ammoniak gelösten Blutspuren ergaben noch in 3 bis 4 Stufen höheren geometrischen Verdünnungen eine positive Reaktion.

Allerdings muß man bei der Anwendung von verdünntem Ammoniak als Lösungsmittel damit rechnen, daß Störsubstanzen (z.B. Farbstoffe) mitherausgelöst werden und in der oben geschilderten Weise durch Eigenfluoreszenz die Reaktion beeinträchtigen können. Erfahrungsgemäß ist eine Störung jedoch nur bei äußerst geringen Spurenmengen zu befürchten. Falls in einem solchen Falle noch Material vorhanden ist, kann man die Reaktion nach entsprechend verlängerter Elution mit Aqua dest. wiederholen.

Als Nachteil des Verfahrens bezeichneten Dotzauer u. Keding (1955) das Arbeiten mit konzentrierter Säure. Sie entwickelten daher eine Modifikation, die darin besteht, daß das in den Blutspuren vorhandene Hämoglobin durch Versetzen mit $n/10$ HCl zunächst in Hämatin umgewandelt wird. Danach setzt man Thioglykolsäure zur Enteisung zu. Nun muß das Gemisch zum Sieden erhitzt werden. Die Intensität der auftretenden Fluoreszenz nimmt mit dem Abkühlen der Lösung zu.

Zur Prüfung der Frage, welche der beiden Methoden die bessere ist, haben wir sie unter sonst gleichen Bedingungen einander gegenübergestellt.

Gleich starke Blutverdünnungen wurden einerseits mit Schwefelsäure versetzt und andererseits nach 15 Minuten langer Einwirkung von n/10 Salzsäure mit Thioglykolsäure versetzt, bis zum Sieden erhitzt und nach anschließendem Abkühlen ebenso wie die schwefelsäurehaltige Probe unter der Analysen-Quarzlampe untersucht. Eine Rot-Fluoreszenz wurde nach Versetzen mit Schwefelsäure bis zu einer Vollblutverdünnung von 1 : 2048, mit HCl/Thioglykolsäure dagegen nur bis 1 : 64 festgestellt.

Die *Schwefelsäuremethode* ist also nicht nur sehr viel einfacher, sondern sie erlaubt auch weit geringere Hb-Mengen zu erfassen als die HCl/Thioglykolsäure-Modifikation der Porphyrinprobe, abgesehen davon, daß der penetrante Geruch der Thioglykolsäure als ein erheblicher Nachteil anzusehen ist. Die Tatsache, daß die Rot-Fluoreszenz bei der HCl/Thioglykolsäure-Modifikation wesentlich länger anhält als nach Verwendung von Schwefelsäure ist ohne praktische Bedeutung, weil das Analyseergebnis grundsätzlich sofort beurteilt wird.

Literatur

- Danckwortt, P.W.: Zit. nach Danckwortt, P.W. Eisenbrand, I., *Luminiszenz-Analyse im filtrierten ultravioletten Licht*. S. 169 7. Aufl. 1964 Leipzig: Akadem. Verlagsgesellschaft Geest und Portig
- Dotzauer, G., Keding, G.: Die Umwandlung des Blutfarbstoffs in Porphyrin mittels Thioglykolsäure. *Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med.* 44, 550 (1955)
- Heller, R.: Die Fluoreszenz der Hämoglobinderivate und ihre Bedeutung für den forensischen Blutnachweis. *Vjschr. gerichtl. Med.* 3.F.-51, 219 (1916)
- Hoppe-Seyler, F.: Zit. nach Dotzauer u. Keding
- Kind, S.S.: Absorptions-Elution grouping of dried blood smears. *Nature (London)* 185, 397 (1960)
- Schleyer, F.: *Leitfaden der gerichtlich-medizinischen Blutuntersuchung*. Lübeck: Verlag Schmidt-Römhild 1966
- Schwerd, W.: *Der rote Blutfarbstoff und seine wichtigsten Derivate*. Lübeck: Verlag Schmidt-Römhild 1961
- Schwerd, W., Birkenberger, H.: Beeinflussung des spezifischen Blutnachweises durch Vorproben. *Z. Rechtsmedizin (im Druck)*
- Wagenaar, M.: Beiträge zur mikroskopischen, mikro-spektroskopischen und quantitativen Blutuntersuchung. *Z. Anal. Chem.* 79, 107 (1929)

Eingegangen am 5. April 1977