

Über das Verhalten gewisser organischer Verbindungen gegenüber Blut mit besonderer Berücksichtigung des Nachweises von Blut.

Von

Oskar Adler und Rudolf Adler.

(Der Redaktion zugegangen am 7. Januar 1904.)

I.

Von den chemischen Methoden zum Nachweise von Blut kommt die Darstellung der Hämkristalle an erster Stelle in Betracht; als unterstützend für die Erkennung des Blutes kann unter Umständen auch der Nachweis der Eiweißkörper und des Eisens von Bedeutung sein. In klinischer Beziehung erfreut sich die Guajakprobe allgemeiner Anwendung zum Nachweise von Blut im Harn, im Magensaft und in den Faeces. In letzter Zeit fand diese Probe in Vitali¹⁾ einen warmen Fürsprecher. Bekanntlich beruht die Guajakprobe auf der Fähigkeit des Hämoglobins, den aus dem Terpentinöl oder Wasserstoffsuperoxyd stammenden Sauerstoff auf den wirksamen Bestandteil des Guajakharzes, der von Hadelich als Guajakonsäure bezeichnet wurde, zu übertragen, wodurch ein in neutraler oder saurer Lösung blauer Körper entsteht, den man als Guajakonsäureozonid bezeichnet hat.

An Stelle der Guajaktinktur haben wir uns mit Vorteil zum Nachweise von Blut des Guajacins bedient, eines von Schmitt²⁾ aus Guajakholz dargestellten Körpers, der sich durch größere Empfindlichkeit auszeichnet. Wir versetzen die zu untersuchende Flüssigkeit mit etwas Wasserstoffsuperoxyd und überschichten mit einer alkoholischen Guajacinlösung.

In neuerer Zeit hat Rossel³⁾ zum Nachweise von Blut im Harn das Barbados-Aloin empfohlen. Die Probe steht nach Utz⁴⁾ in ihrer Empfindlichkeit der Guajakprobe nach.

¹⁾ Vitali, Giorn. di Farmac. di Trieste 1902, Bd. 7, S. 193.

²⁾ Schmitt, Le Bois de Gajac, Thèse de Nancy, 1875, u. Mercks Bericht 1902, S. 75.

³⁾ Rossel, Schweizer. Wochenschrift Chem. Pharm. 1901, Nr. 39, S. 557 ff.

⁴⁾ Utz, Österr. Chem. Ztg. 1902, Bd. 5, S. 558.

In der vorliegenden Arbeit haben wir uns die Aufgabe gestellt, eine größere Anzahl von chemischen Verbindungen, die durch Oxydation eine Farbenreaktion erfahren, systematisch auf ihr Verhalten gegenüber Blut (bei Zusatz von Wasserstoffsuperoxyd) zu untersuchen. Ein Teil dieser Körper war bisher zum Nachweise von Ozon¹⁾ und von oxydierenden Fermenten (Oxydasen)²⁾ in Verwendung. Insofern wir auch auf die Empfindlichkeit der Reaktionen, sowie auf das Verhalten der Kontrollreaktionen Rücksicht genommen haben, dürften die Resultate unserer Arbeit vielleicht auch für das Studium von oxydierenden Fermenten einiges Interesse bieten.

II.

Im nachfolgenden wollen wir das Resultat unserer systematischen Untersuchungen mitteilen. Von der großen Reihe der hier in Betracht kommenden Körper haben wir uns nur auf die aromatischen Amidokörper, Phenole, aromatischen Säuren, auf die Diphenyl- und Naphtalingruppe beschränkt.³⁾ Im Anschlusse daran untersuchten wir das Verhalten der Reduktionsprodukte gewisser Teerfarbstoffe (Leukobasen).

Das bei den Versuchen verwendete Blut wurde unmittelbar nach der Entnahme aus der Carotis des Tieres (Kaninchen) defibriniert und zum Zwecke der Untersuchung durch Verdünnen mit destilliertem Wasser auf die bestimmte Konzentration gebracht. Die Reaktionen wurden nun derart angestellt, daß unter Zusatz von Wasserstoffsuperoxyd bei einer Konzentration von 0,001% Blut (d. i. 100000fache Verdünnung) begonnen und der Versuch bis zur deutlichen Farbenreaktion bzw. Farbendifferenz gegenüber der Kontrolle fortgesetzt wurde. Diesen Punkt bezeichnen wir, wie aus der nachfolgenden Tabelle ersichtlich ist, als die Empfindlichkeitsgrenze der Reaktion.

¹⁾ Vergl. C. Arnold und C. Mentzel, D. chem. Ges., Ber. 1902, Bd. 35, S. 1324 u. 2902; Chlopin, Zeitschr. f. Untersuch. v. Nahrungs- und Genußm. 1902, Bd. 5, S. 504 u. a. a. O.

²⁾ Vergl. Neumann-Wender, Chem. Ztg. 1902, Bd. 26, S. 1217 u. 1221 u. a. a. O.

³⁾ Thalliumhydroxydul zeigt gleichfalls unter gleichen Umständen das Vorhandensein von Blut an. Auf die übrigen anorganischen Körper haben wir nicht Rücksicht genommen.

Zum Verständnisse der Tabelle sei hinzugefügt, daß sämtliche Reaktionen unter Zuhilfenahme von Kontrollen (gleiche Versuchsbedingungen, jedoch Abwesenheit von Blut) angestellt wurden. Zeigte die Kontrolle keine Farbenänderung, so wurde sie als negativ bezeichnet; erfuhr jedoch das Kontrollreagens bereits durch den Luftsauerstoff eine Farbenänderung, so konnte naturgemäß nur die Farbendifferenz in Berücksichtigung gezogen werden.

| | Reaktion der Lösung | Farbenreaktion | Empfindlichkeitsgrenze ‰ Blut | Kontrolle |
|--|---|----------------|----------------------------------|---|
| A. Amidkörper | | | | |
| a) Monamine | | | | |
| Anilin | sauer (HCl, H ₂ SO ₄) | schwarzgrün | 0,1 | negativ |
| Monomethylanilin | sauer (HCl) | schmutzviolett | 0,1 | » |
| Dimethylanilin | » | hellgelb | 0,1 | » |
| Diphenylamin | sauer (C ₂ H ₄ O ₂) | grün | — | » |
| p-Toluidin | sauer (HCl) | rot | 0,01 | » |
| Xylidin | » | braunrot | wenig empfindlich | » |
| b) Diamine | | | | |
| o-Phenylendiamin | neutral | braun | 0,007 | } nach einigem Stehen tritt Verfärbung ein baldiger Farbausgleich |
| m-Phenylendiamin | » | violett | 0,007 | |
| p-Phenylendiamin | » | braun | 0,007 | |
| Dimethyl-p-phenylendiamin | » | rot | 0,009 | |
| Tetramethyl-p-phenylendiamin | » | violett | 0,009 | |
| B. Phenole | | | | |
| a) einwertige Phenole | | | | |
| Phenol ¹⁾ | neutral od. alkalisch (NaOH) | rotbraun | wenig empfindlich | negativ |
| p-Amidophenol | alkalisch (NaOH od. Na ₂ CO ₃) | violett | 0,008 | baldiger Farbausgleich |
| o-Kresol ²⁾ , ¹⁾ | neutral od. alkalisch (NaOH) | rotbraun | wenig empfindlich | negativ |
| m-Kresol ²⁾ , ¹⁾ | neutral od. alkalisch (NaOH) | » | wenig empfindlich | » |
| p-Kresol ²⁾ , ¹⁾ | neutral od. alkalisch (NaOH) | braunrot | wenig empfindlich | » |
| Thymol | alkalisch (NaOH od. Na ₂ CO ₃) | » | wenig empfindlich | » |

¹⁾ Alkoholische Lösung.

²⁾ Kreosot aus Buchholzteer zeigt naturgemäß ähnliches Verhalten.

| | Reaktion der Lösung | Farbenreaktion | Empfindlichkeitsgrenze ‰ Blut | Kontrolle |
|------------------------------|---|---------------------------------|----------------------------------|-------------------------------------|
| B. Phenole | | | | |
| b) zweiwertige Phenole | | | | |
| Brenzkatechin | alkalisch (NaOH) | grün | 0,005 | nach einigem Stehen Farbausgleich |
| Guajakol ¹⁾ | » | gelbbraun | 0,05 | negativ |
| Resorcin | » | grünlich | 0,01 | } nach einigem Stehen Farbausgleich |
| Hydrochinon | » | braungelb | 0,005 | |
| Orcin | » | rot | 0,002 | nach längerem Stehen Farbausgleich |
| c) dreiwertige Phenole | | | | |
| Pyrogallol | » | braun | 0,005 | } baldiger Farbausgleich |
| Phloroglucin | » | violett | 0,005 | |
| C. Aromatische Säuren | | | | |
| Benzoessäure | alkalisch (NaOH) | — | — | — |
| Salicylsäure | » | braun | sehr wenig empfindlich | negativ |
| Protocatechusäure | » | rosa (allmählich verschwindend) | 0,001 | negativ (gelblich) |
| Gallussäure | » | braun | 0,005 | Farbausgleich |
| Diphenylgruppe | | | | |
| Benzidin ¹⁾ | sauer (C ₂ H ₄ O ₂) | grün ²⁾ | 0,001 | negativ |
| Tolidin ¹⁾ | » | } rot } grün | } 0,05 } 0,25 | » |
| Naphtalingruppe | | | | |
| α-Naphtol | alkalisch (NaOH) | braun | } ³⁾ | negativ |
| β-Naphtol | » | braungelb | | |
| α-Naphtylamin ¹⁾ | sauer (HCl) | schmutziggelb | wenig empfindlich | » |

1) Alkoholische Lösung.

2) Nach längerer Zeit blau werdend.

3) Empfindlichkeit wurde nicht bestimmt.

III.

Aus der vorstehenden Tabelle ist also ersichtlich, daß sich die einzelnen Vertreter der angeführten Gruppen (Amidokörper, Phenole, Säuren) bei der angegebenen Behandlung in verschiedener Weise äußern, und zwar derart, daß im allgemeinen bei den höheren Gliedern eine größere Empfindlichkeit zu bemerken ist.

Im Anschluß an diese Versuche haben wir eine Reihe leichtoxydabler Leukobasen der Triphenylmethanreihe untersucht. Es stellte sich heraus, daß sich die Gruppe des Malachitgrüns (Malachitgrün, Brillantgrün, Säuregrün) und die Rosanilinderivate (Dahlia, Methylviolett, Kristallviolett) zu dem genannten Zweck am vorteilhaftesten eignen. Die übrigen Triphenylmethanfarbstoffe (Alkaliblau, Ketonblau, Patentblau, Cyanin, Türkisblau), ferner die Eosine und Rhodamine führten nicht zu einem günstigen Resultate.

An dieser Stelle sei den Farbwerken vorm. Meister, Lucius und Brüning für die große Anzahl ihrer Produkte, die sie uns zur Verfügung stellten, herzlichst gedankt.

Wenn man berücksichtigt, daß alle die vorgenannten Reaktionen dadurch zustande kommen, daß der Blutfarbstoff den aus dem Wasserstoffsperoxyd stammenden Sauerstoff an die betreffenden oxydationsfähigen Körper überträgt, so wird sich naturgemäß ergeben, daß auch andere Körper analoge Reaktionen hervorrufen können.

Von den in Betracht kommenden Körpern seien hier genannt die Eisenoxydulsalze (Vitali),¹⁾ die Rhodansalze (Tarugi),²⁾ ferner gewisse oxydierende Fermente (indirekte Oxydasen),³⁾ denen allen die Fähigkeit zukommt, bei Gegenwart von Wasserstoffsperoxyd als indirekte Oxydationsmittel zu wirken. In tierischen, Leukocyten führenden Flüssigkeiten (Harn, Speichel, Eiter) werden oxydierende Fermente zu vermuten sein, welche durch Kochen zerstört werden können. Eiter, der Spuren von

¹⁾ Vitali, Giorn. di Farmac. di Trieste 1902, Bd. 7, S. 193.

²⁾ Tarugi, Gazz. chim. ital. 1902, 32, 1 Vol. 505.

³⁾ Vgl. Bourquelot, Congr. Pharm. Paris 1899, Répert. Pharm. und Neumann-Wender, Chem. Ztg. 1902, Bd. 26, 1217 u. 1221 ff.

Blut enthält, wie er in der Praxis im allgemeinen anzutreffen ist, wird infolge seines Blutgehaltes naturgemäß auch nach dem Kochen die Reaktionen ergeben. Die Versuche über das Verhalten des von jeder minimalsten Spur Blut freien Eiters sind bisher nicht abgeschlossen.

Im Gegensatze zu den früheren Körpern werden andererseits reduzierende Substanzen auch einen störenden Einfluß ausüben können. So vermag die Harnsäure die Empfindlichkeit der Leukomalachitprobe (s. u.) herabzumindern; doch kann man die letztere ausscheiden, falls man analog wie Weber bei der Guajakprobe vorgeht (s. u.). Endlich muß betont werden, daß jene Körper, welche sekundäre Reaktionen hervorrufen (Eisen-salze: Gelbfärbung des Malachitgrüns; salpetrige Säure: Bildung von Diazokörpern), Berücksichtigung finden müssen.

Faßt man das bisherige Versuchsergebnis zusammen, so läßt sich behaupten, daß selbst die geringsten Spuren von Blut (100 000fache Verdünnung) durch einige der früher genannten Reaktionen zu erkennen sind, so daß beim negativen Ausfall der Proben (s. u.) wohl mit Sicherheit auf die Abwesenheit von Blut geschlossen werden kann.

Im nachfolgenden seien einige Vorschläge für die praktische Ausnützung der erwähnten Blutproben angeführt.

IV.

Nachweis von Blut.

Der chemische Nachweis von Blut ist sowohl in klinischer, als auch in forensischer Beziehung von großer Bedeutung und man hat sich daher seit langem bemüht, Methoden auszusinnen, die den Nachweis selbst minimalster Mengen von Blut ermöglichen. Aber nicht nur der positive Nachweis von Blut, sondern auch der strikte Beweis der Abwesenheit selbst minimalster Mengen von Blut kann unter Umständen von großer Bedeutung sein.

Nun ist es bekannt, daß der negative Ausfall einer unserer feinsten Methoden, der Darstellung der Häminkristalle unter gewissen Bedingungen nicht den sicheren Schluß zuläßt, daß Blut nicht vorhanden sei, und es sind Fälle bekannt, wo trotz

des negativen Ausfalles der Teichmannschen Probe auf das Vorhandensein von Blut erkannt wurde.

Im folgenden wollen wir einige Proben anführen, die den Nachweis von Blutflecken, den Nachweis von Blut im Wasser, im Harn und in den Faeces betreffen.

Erkennung von Blutflecken. Zum Nachweis von Blutflecken haben wir uns des Leukomalachitgrüns (Leukobase des Malachitgrüns) bedient. Die Probe stellen wir in folgender Weise an: Der zu untersuchende Fleck wird mit dem Reagens (s. u.) gut durchtränkt und hierauf mit einer 3%igen Lösung von Wasserstoffsperoxyd übergossen. Handelt es sich um einen Blutfleck, so wird dieser sofort intensiv grün. Auch bei geringen, kaum wahrnehmbaren Blutspuren tritt die Reaktion mit voller Schärfe ein. Ebenso tritt die Reaktion auch bei gekochten Blutflecken ein.

Das Reagens stellen wir am vorteilhaftesten in folgender Weise dar: Man bereitet eine konzentrierte Lösung der völlig farblosen, chemisch reinen Leukobase des Malachitgrüns (Tetramethyldiamidotriphenylmethan)¹⁾ in Eisessig. Zur Entfernung der selbst bei Verwendung eines vollkommen farblosen Präparates meist auftretenden minimalen Grünfärbung setzt man der Lösung eine gleiche Menge von Chloroform hinzu. Man tropft nun in die Mischung unter vorsichtigem Schwenken so lange Wasser, bis das Chloroform vollständig ausgefallen ist. Hierauf trennt man das grüngefärbte Chloroform von dem darüber befindlichen Reagens. Eine etwa vorhandene Trübung des Reagens, welche durch Ausfallen der Leukobase bedingt sein kann, wird durch Zusatz von Eisessig beseitigt. Sollte das Reagens noch Spuren einer Grünfärbung aufweisen, so wird diese durch Ausschütteln mit wenig Chloroform entfernt. — Das so bereitete Reagens muß vollkommen farblos sein.

Wie wir bereits hervorgehoben haben, können auch andere Körper als Blut einen positiven Ausfall der Probe bedingen und es ergibt sich daher die Forderung, auf das etwaige Vorhandensein solcher Körper Rücksicht zu nehmen. Diesbezüglich verweisen wir auf das im Abschnitt III S. 63 f. Gesagte.

Was den negativen Ausfall der Probe betrifft, so hat sich ergeben, daß bei Gegenwart reichlicher Menge von Eisensalzen

¹⁾ Eine für diese Zwecke eigens hergestellte Leukobase kann von dem Chemischen Laboratorium der Großdrogerie Wilhelm Adler in Karlsbad bezogen werden, wo auch das fertige Reagens erhältlich ist.

trotz Vorhandenseins von Blut die Grünfärbung ausbleiben kann und statt derselben eine Gelbfärbung auftritt; Eisensalze sind daher auszuschließen. (Eisenproben.)

Demnach kann bei Berücksichtigung aller Kautelen bei negativem Ausfalle unserer Probe auf die Abwesenheit selbst minimalster Blutspuren geschlossen werden.

Nachweis von Blut in Wasser. •

Zum Nachweise von Blut im Wasser dürften sich Leukomalachitgrün (siehe Bereitung des Reagens), Kristallviolettleukobase und ferner das Benzidin wegen ihrer großen Empfindlichkeit und wegen des vollkommen negativen Ausfallens der Kontrollversuche empfehlen.

Bei der Benzidinprobe verwenden wir eine in der Hitze konzentrierte und nach dem Abkühlen filtrierte alkoholische Benzidinlösung.

Zur Anstellung der Probe wird das zu prüfende Wasser mit etwas Wasserstoffsperoxyd und einigen Tropfen Essigsäure versetzt und hierauf einige Kubikzentimeter der Benzidinlösung hinzugefügt. Bei Gegenwart von Blut tritt eine prachtvolle Grünfärbung auf.

Auch nach dem Kochen gibt bluthaltiges Wasser die Proben.

Bezüglich der Kautelen verweisen wir auf das im Abschnitte III, S. 63 f. Gesagte.

Bemerkenswert ist die große Empfindlichkeit der Leukomalachitgrünprobe und Benzidinprobe im Vergleich mit der spektroskopischen Methode und mit der Teichmannschen Probe. Während die Teichmannschen Kristalle noch bei mindestens 20 000 facher Verdünnung¹⁾ dargestellt werden können, während ferner bei der Guajakprobe noch bei 5000-facher²⁾ Verdünnung eine Blaufärbung eintritt, geben die Leukomalachitgrünprobe und die Benzidinprobe noch bei 100 000 facher Verdünnung des Blutes deutliche Farbenreaktionen.

¹⁾ Hager, Handbuch der pharm. Praxis 1903, Bd. II, S. 879.

²⁾ Hager, l. c., S. 881.

Nachweis von Blut im Harn und in den Faeces.

Harn: Das bereits früher erwähnte Leukomalachitgrün und Benzidin eignet sich auch zum Nachweis von Blut im Harn, wenn man nach Analogie der Weberschen Modifikation der Guajakprobe vorgeht.

Man versetzt 10—15 ccm Harn mit dem halben Volumen Eisessig. Hierbei wird das Hämoglobin in Hämatin umgewandelt. Hierauf wird mit Äther ausgeschüttelt, wobei das Hämatin in den Äther übergeht. Sollte der Äther mit dem Gemische eine Emulsion bilden, so kann durch Zusatz einiger Tropfen Alkohol eine Scheidung der Flüssigkeiten bewerkstelligt werden. Man hebt den Äther ab und setzt nun das Leukomalachitgrünreagens und etwas Wasserstoffsperoxyd hinzu. Sollte hierbei etwas von der Leukobase ausfallen, so kann diese durch Zusatz von etwas Eisessig wieder in Lösung gebracht werden.

Statt des Leukomalachitgrünreagens kann man dem Äther alkoholische Benzidinlösung, etwas Wasserstoffsperoxyd und einige Tropfen Essigsäure hinzufügen.

War der Harn bluthaltig, so treten die bereits früher erwähnten Farbenreaktionen ein.

Faeces: Eine kleine Quantität der zu untersuchenden Faeces wird mit etwas Wasser aufgeschwemmt. Man versetzt 3 ccm der unfiltrierten Aufschwemmung mit 2 ccm der früher erwähnten Benzidinlösung und mit 2 ccm Wasserstoffsperoxyd (3%) und fügt einige Tropfen Essigsäure hinzu. Bei Gegenwart von Blut tritt eine intensive Grünfärbung ein.