

## **Die Vereinfachung von macro- und microchemischen Eisen-reactionen.**

Von

**Dr. St. Szcz. Zaleski,**

ord. Professor d. Chemie a. d. Kais. Universität zu Tomsk (West-Sibirien).

(Der Redaction zugegangen am 5. October 1889.)

Die Bedeutung des Eisens in der Oeconomie des Pflanzen- und Thierlebens unterliegt bekanntlich gar keinem Zweifel. Auf Kosten dieses, mit der Nahrung aufgenommenen Metalls wird das Blut gebildet. Der Mangel an Eisen führt zum Mangel an Blut und zu den Abweichungen in der Zusammensetzung desselben. Nicht geringere Abweichungen bei ver- hinderter oder abgeschlossener Eisenzufuhr finden auch in den Functionen und in der Entwicklung der Pflanzen statt, denn bei ungenügender Menge dieses Metalls büsst das Chloro- phyll seine Haupteigenschaft ein, Kohlensäure unter Ein- wirkung von Sonnenlicht zu spalten und ihre Bestandtheile zu assimiliren, wodurch die Pflanzen ihre Farbe verlieren, verwelken und schliesslich vollständig zu Grunde gehen. Jedoch die ausserordentlich grosse Bedeutung des Eisens wird lange noch nicht damit erschöpft. Bei Verfolgung der Wege seiner Aufnahme und Wanderung in den Organismen ver- schiedener Thiere und Pflanzen stossen wir auf eine Reihe physiologisch-chemischer und allgemein-biologischer Fragen von ganz besonderer Wichtigkeit, wie z. B. wo das Blut gebildet wird, ob es in der That einem Zerfall unterliegt und, wenn es der Fall sein sollte, in welchen Organen und auf welche Weise dieser Zerfall stattfindet, inwiefern wird

die Entwicklung der lebendigen und der latenten Kraft in den Organismen durch das Eisen beeinflusst, auf welche Art und Weise dieses Metall durch die Pflanzen und Thiere resorbiert wird, welchen Metamorphosen es dabei unterliegt, ob es und inwiefern die Synthesen und den Zerfall der Bestandtheile verschiedener Organismen bewirkt; wie es sich zu verschiedenen krankhaften Processen verhält und vieler, vieler anderen. Die Bahn zur Lösung dieser sämtlichen Fragen muss erst durch eine Reihe specieller, complicirter Untersuchungen dargelegt werden: vor Allem ist unbedingt nöthig zu erforschen, wie das Eisen topographisch in verschiedenen Organen und Geweben, bei allen möglichen Ernährungszuständen und Bedingungen derselben und bei möglichst mannigfaltigen Vertretern beider organisirten Naturreiche vertheilt wird, wobei nicht nur der normale Zustand, sondern auch der pathologische, je nach der Natur und dem Verlaufe der Erkrankung Berücksichtigung finden muss. Dieser Zweck lässt sich auf doppeltem Wege erreichen: einerseits vermittelt genauer chemischer Quantitativbestimmungen nach Einäscherung der zu untersuchenden Organe, Gewebe, fester Stoffe und Flüssigkeiten, andererseits — auf dem sog. macro- und microchemischen Wege, d. h. durch unmittelbare Anwendung der Eisenreagentien direct auf den zu erforschenden Körper, welchen man darauf eingehend macroscopisch und microscopisch untersucht. Im letzten Fall erlangt man nur einen relativen Begriff von den Metallmengen nach der Intensität der Reaction; dafür ist man im Stande, den Charakter und die Oxydationsstufe der Eisenverbindungen näher zu bestimmen. Beide Untersuchungsmethoden sollen natürlich Anwendung finden überall, wo es nur möglich ist. Es geschieht jedoch zuweilen, dass die quantitative Analyse unmöglich durchzuführen ist, zumal es sich um niedere Organismen von ganz geringen Dimensionen, oder ganz kleine, schwer einer quantitativen Bestimmung zu unterziehende Organe handelt. Die einzige Zuflucht in solchen Fällen ist in der macro- und microchemischen Untersuchung zu suchen. Daher jede Vereinfachung und Vervollkommnung der Methoden der

letzten muss als ein Erwerb für die Wissenschaft betrachtet werden.

Die microchemischen Eisenreactionen der Organe und Gewebe sind schon verhältnissmässig ziemlich lange bekannt und wurden nicht selten, jedoch nur immer in pathologischen Fällen angewandt. Erst vor ungefähr vier Jahren habe ich die Möglichkeit gehabt, sie in grösserem Massstabe auch für physiologisch-chemische Zwecke zu verwerthen, wobei von mir zugleich der Begriff von macrochemischen Untersuchungen, als Gegensatz zu den microchemischen, eingeführt wurde. Näheres darüber findet man in meinen früheren Arbeiten<sup>1)</sup>, in denen zugleich sämtliche Manipulationen und Eingriffe bei der Ausführung der erwähnten sowohl von Anderen angewandten wie von mir eingeführten und näher geprüften Eisenreactionen eingehend besprochen worden sind und zugleich der Nachweis geliefert, dass es zuweilen wohl gelingt, in manchem Organe oder Gewebe das Vorhandensein des Eisens selbst in verhältnissmässig ziemlich geringen Mengen macrochemisch festzustellen, ohne jedoch auf microchemischem Wege das Ziel erreicht zu haben. Es können aber dann und wann auch ganz entgegengesetzte Verhältnisse vorkommen, nämlich das Vorhandensein des Eisens in einer solchen Menge, dass nur die Resultate der microchemischen Untersuchung sich als positiv erweisen. Jedoch in bedeutender Mehrzahl der Fälle erscheinen beide Untersuchungsverfahren als gleichwerthig, indem sie zuweilen negative, meistentheils aber positive Resultate zugleich liefern. Man soll sich daher nie auf eins dieser Verfahren einschränken und bei jeder Gelegenheit auf keins derselben verzichten.

Seit jener Zeit bestand mein Hauptzweck darin, das umständliche Verfahren bei der Ausführung der in Rede stehenden Reactionen nach Möglichkeit zu vereinfachen und

<sup>1)</sup> St. Szcz. Zaleski: 1) Przegł. lek. und Virchow's Archiv, Bd. CIV. 2) Wojenno-medic. Żurn., 1886, und Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. X. 3) Wratsch 1886; Gaz lek. und Med. Centralbl., 1887. 4) und 5) Wojenno-medic. Żurn., 1888, und Arch. f. exp. Path. u. Pharmacol., Bd. XXIII.

noch mehr zu vervollkommen. Um dies zu erreichen, habe ich mir als Aufgabe gestellt:

1. falls uns nur ein ganz kleines Stückchen des zu untersuchenden Gewebes oder Organes zu Gebote steht, lange nicht ausreichend zur Ausführung der macrochemischen Reactionen unabhängig von den microchemischen, im Stande zu sein, eines und dasselbe Material für einen und für den anderen Zweck verwerthen zu können;
2. die Dauer des langwierigen Processes bei der Ausführung der Reaction auf jedem Schnitte einzeln nach Möglichkeit abzukürzen;
3. die Schnitte mit bereits fertiger Eisenreaction serienweise nicht nur von einem Thier- resp. Pflanzenorgan oder Gewebe, sondern auch von einem ganzen Embryo, ja selbst von einem kleinen ungetheilten Thiere zu gewinnen.

Die Untersuchungen über zweckentsprechende Vorbereitung der Pflanzengewebe sind von mir noch nicht zum Abschluss gebracht worden; ich erlaube mir daher vorläufig nur die sich auf Thierorgane und Gewebe beziehenden Ergebnisse im Vorliegenden mitzutheilen.

Als Universalmittel zum macro- und microchemischen Nachweis von Eisen überhaupt, ohne Rücksicht auf die Oxydationsstufe desselben, muss unbedingt einerseits Schwefelammonium und andererseits gelbes Blutlaugensalz nach Ansäuerung mit Salzsäure betrachtet werden. Die Eisenoxydulverbindungen lassen sich mit rothem Blutlaugensalz auch nach Zusatz von Salzsäure nachweisen; für Eisenoxydverbindungen ist Rhodankalium ebenfalls in salzsaurer Lösung anzuwenden. Auf alle diese cardinale und charakteristische Reactionen versuchte ich eine ganz besondere Aufmerksamkeit zu lenken, ohne jedoch dabei vergessen zu haben, dass die Rhodankaliumreaction, obwohl an und für sich sehr empfindlich, dennoch an einem Mangel leidet: es wird nämlich durch das in dem Gewebe nachzuweisende Eisen nicht nur das Gewebe

selbst, sondern auch zuweilen die als Reagens angewandte Flüssigkeit charakteristisch roth verfärbt.

Bei Ausführung der Reaction mit Schwefelammonium genügt das bezügliche Präparat — je nach der Grösse desselben — auf 2 Minuten bis  $\frac{1}{2}$  Stunde und länger in 1%—3% wässrige oder alkoholische Lösung von Schwefelammonium einzutauchen. Der Reaction bei geringen Eisenmengen ist eine dunkelgrüne Farbe eigen, falls aber grössere Mengen vorhanden sind — eine stark ausgesprochene schwarze. Die Reactionen vermittelt anderer Reagentien, und zwar Rhodankalium, gelben und rothen Blutlaugensalzes, beruhen darin, dass man das entsprechende Präparat binnen eben eines solchen Zeitraumes, wie in vorigem Fall, mit 1%—3% Lösung des bezüglichen Salzes behandelt und darauf, nach schneller Durchspülung in eine schwache, etwa 2% alkoholische, oder wässrige Salzsäurelösung eintaucht. Für Rhodankalium ist eine blutrothe Färbung charakteristisch, für übrige Reagentien — je nach der Intensität der Reaction — eine hell- oder dunkelblaue. Die Empfindlichkeit sämmtlicher Reactionen ist eine ganz besonders grosse.

Um den drei oben angeführten Bedingungen genügende Präparate zu gewinnen, wenn es sich um Schwefelammoniumreaction handelt, verfare ich folgendermassen: Ein Stückchen des betreffenden Organes oder Gewebes etwa von derselben Grösse, wie es sonst bei der Erhärtung von histologischen Präparaten üblich ist, wird auf 24 Stunden in einem 65% Alkohol liegen gelassen und darauf in ein Gefäss übergeführt, welches bis zum Halse mit 96% Alkohol erfüllt ist, dem einige Tropfen von starkem, gelben Schwefelammonium hinzugesetzt sind. Das Gefäss wird mit gut eingeschliffenem Glasstöpsel dicht abgeschlossen und binnen 24 Stunden von Zeit zu Zeit umgeschüttelt. Bei irgendwie beachtenswerthen Eisenmengen nimmt das Präparat nicht nur auf der Oberfläche, sondern auch im Innern eine grüne Farbe an, welche dunkler wird, falls mehr Eisen vorhanden ist, und schliesslich in eine schwarze übergeht, wenn die Metallmengen beträchtlich sind. Behufs definitiver Erhärtung des Präparates und möglichst

vollständiger Entziehung des Wassers aus demselben wird es in absoluten, mit einigen Tropfen von gelbem Schwefelammonium versetzten Alkohol übergeführt, wobei die Lösung einen strohgelben Schimmer haben und das Gefäss bis zum dicht anliegenden Glasstöpsel ausfüllen soll. Gewöhnliche Pfropfen sind unbrauchbar, denn sie liefern an und für sich eine Eisenreaction mit Schwefelammonium und werden leicht durch verhältnissmässig sehr schnelle Diffusion des letzten verdorben. Alle erwähnten Vorsichtsmassregeln sind unentbehrlich, damit die Reaction unter dem oxydirenden Einfluss der Luft nicht beeinträchtigt wäre, ja — nicht vollständig verschwinde. Aus diesem Grunde ist der absolute Alkohol an und für sich für die Aufbewahrung der Präparate mit fertiger Reaction nicht ausreichend und man soll daher nie versäumen, zu demselben einige Tropfen von gelbem Schwefelammonium zuzusetzen. Die auf solche Art und Weise angefertigten Präparate können je nach dem Bedürfniss auf dem Microtom oder mit der Hand geschnitten und, falls die Zahl der Präparate genügend, in einer und derselben Lösung bis auf Weiteres aufbewahrt werden. Wird das Präparat geschnitten, so soll man nie ausser Acht lassen, dasselbe von der Oberfläche mit absolutem Alkohol abzuspülen, da die Klinge des Messers durch Schwefelammonium bei längerem Contact mit dem letzten angegriffen sein kann. Bei schneller und ununterbrochener Untersuchung lässt die Reaction unter dem Einfluss der Luft kaum nach, will man jedoch die Untersuchung verschieben, so ist es unentbehrlich, zum Alkohol, in welchem die Schnitte aufbewahrt werden, einen Tropfen von Schwefelammonium hinzuzusetzen und das Gefäss mit gut angepasster Glasplatte sorgfältig zu bedecken.

Auch vorher injicirte oder en masse gefärbte Präparate eignen sich zur Ausführung der eben beschriebenen Reaction, wobei jedoch zu berücksichtigen wäre, dass man die Farbe sowohl des Färbungsmittels wie der Injectionsmasse entsprechend wähle und damit das Schwefelammonium auf dieselben keine schädliche Wirkung ausübe.

Ein wenig abweichend ist das Verfahren, nach welchem es mir gelungen ist, analoge Präparate durch Anwendung aller übrigen Reagentien zu erlangen. Die Theile der betreffenden Organe oder Gewebe werden zunächst auf 24 Stunden in 65% Alkohol hineingelegt und dann — je nach der Reaction, die man zu erreichen wünscht — in eine 1% Lösung von gelbem oder rothem Blutlaugensalz oder, schliesslich, Rhodankalium in 96% Alkohol übergeführt, wo sie wenigstens 2—3 Tage bleiben und von Zeit zu Zeit durchgeschüttelt werden müssen. Man behandelt sie darauf mit 1% Lösung einer der erwähnten Salze, dieses Mal aber nicht in 96%, sondern in 65% Alkohol und nach etwa 24 Stunden mit 1%—2% Salzsäurelösung in 96% Alkohol. Die vorangehende Anwendung von schwächerem Alkohol hat zum Zweck, in die Pulpa der Gewebe eine gewisse Menge von Wasser einzuführen, wodurch die Endo- und Exosmose für Salzsäure erleichtert wird, welche vermittelt eines bei Weitem stärkeren Alkohols eindringt. Eine vollständige Durchtränkung des Präparates mit Salzsäure wird etwa nach 2—3 Tagen erreicht; ist das Eisen in wahrnehmbaren Mengen vorhanden, so nimmt das ganze Stück sowohl von der Aussenfläche wie im Innern eine diffuse, dem betreffenden Reagens und Eisenverbindung entsprechende Färbung an. Zur endgültigen Entfernung des Wassers und der Salzsäure, welche, bekanntlich, für das Microtom schädlich sein kann, sowohl wie zum ferneren Aufbewahren und Conserviren der Präparate bedient man sich einiger Portionen von absolutem Alkohol. Auf solche Art und Weise gewonnene Präparate lassen sich dann ohne Weiteres ganz bequem sowohl mit der Hand wie auf dem Microtom schneiden.

Auch in diesen Fällen lässt sich eine Färbung en masse der Organstücke und Gewebe mit bereits gewonnener Reaction vornehmen. Bei der Wahl der Farbstoffe muss man dieselben Regeln wie bei Schwefelammonium verfolgen. Ein umgekehrtes Verfahren, d. h. vorangehende Färbung mit nachträglicher Ausführung der Reaction führt in concretem Fall nicht zum Zweck, denn mehrere Farbstoffe werden bekannt-

lich durch Salzsäure entfärbt. Besonders hübsch und lehrreich sind die durch Anwendung von gelbem resp. rothem Blutlaugensalz gewonnenen Präparate mit nachträglicher Färbung durch Carmin. Der Contrast zwischen der blauen und der rothen Farbe liefert in der That ein sehr instructives Bild. Ueberhaupt sind die durch diese Reagentien gewonnenen Präparate bei Weitem mehr zum Färben geeignet, als die durch Schwefelammonium. Ausserdem eignen sie sich ganz besonders zur Anfertigung von microscopischen Dauerpräparaten. Injicirte Organe und Gewebe, wenn nur die Injectionsmasse der Farbe nach gut gewählt ist und der chemischen Einwirkung von Salzsäure widersteht, können auch mit grossem Nutzen zur Anwendung von Reactionen dieser Kategorie verwerthet werden.

Dass die nach sämtlichen oben angegebenen Methoden, d. h. vermittelt Schwefelammonium und anderer Reagentien angefertigten Präparate ohne jeden Nachtheil jahrelang conservirt werden können, ist wohl aus einigen Musterstücken zu schliessen, die sich auf Leber bei Phosphorvergiftung beziehen und die ich noch während meiner Thätigkeit zu Dorpat angefertigt habe. Sie machten eine weite, über einen Monat dauernde Reise von Europa nach Asien bis Tomsk, und jetzt nach etwa 2 Jahren seit der Zeit ihrer Anfertigung ist bei ihnen sowohl von Aussen wie auf der Durchschnittsfläche dieselbe Farbe und Intensität der Reaction wahrzunehmen, wie es ursprünglich der Fall war. Die Resultate einer eingehenden Untersuchung dieser Präparate werden demnächst in einer besonderen Mittheilung besprochen werden.

Dank den angegebenen Vorschriften ist es mir gelungen, eine Eisenreaction in den Organen und Geweben eines totalen Embryo, ja — sogar bei unzergliederten kleinen Thieren zu gewinnen. Die Anwendung dieses Verfahrens für weitere Forschungen kann — meiner Meinung nach — eine fundamentale Bedeutung für die Wissenschaft haben, denn sie giebt uns die Möglichkeit, vergleichende Untersuchungen über den Charakter und die Eigenschaften einer beliebigen Reaction in einzelnen Organen und Geweben

auf der Durchschnittsfläche eines ganzen Organismus anzustellen: die Durchschnittsfläche selbst kann dabei in einer senkrechten, queren, diagonalen und jeder anderen Richtung geführt werden. Die letzt erwähnten Untersuchungen können wiederum zu ganz neuen, bisher vollständig unbekanntem physiologischen Thatsachen und Schlussfolgerungen führen, die man jedoch a priori nicht überschätzen darf.

Tomsk, Chemisches Institut, den 2. 14. September 1889.