

Ueber die Molybdänsäure als mikroskopisches Reagens.

Von

Dr. med. L. Heine, Assistenten des Institutes.

(Aus dem physiologischen Institut zu Marburg.)

(Der Redaction zugegangen am 16. April 1896.)

Lilienfeld und Monti haben zum Nachweis des freien und gebundenen Phosphors in den thierischen Geweben folgende Reaction angewandt:

Sie behandelten frische Schnitte und Schnitte gehärteter Objecte mit Ammoniummolybdat (in salpetersaurer Lösung), wuschen aus, reducirten das zurückgehaltene Molybdänsalz durch 25% Pyrogalllösung zu Molybdänoxid und schlossen aus einer Reihe derartiger Versuche, dass die entstehende Blau- und Braunfärbung auf Phosphor zu beziehen sei¹⁾. Diese Reaction ist von einzelnen Forschern bestätigt, bezw. erweitert, von anderen angezweifelt worden.

Gourlay²⁾ wandte die Reaction zur Aufsuchung des Nucleoalbumins in den Organen an.

Pollacci³⁾ empfiehlt als Reductionsmittel Zinnchlorür. Im Uebrigen scheint er keine Untersuchungen über die Zuverlässigkeit der Reaction gemacht zu haben.

In der That gibt die Reduction mit SnCl_2 viel schärfere, tief blaue, fast mit Methylenblautinktionen zu verwechselnde Bilder.

Raciborski⁴⁾ meint hingegen, die von den obigen Autoren als schwache Phosphorreaction gedeutete Gelbfärbung

¹⁾ Zeitschr. f. physiol. Chem., Bd. 17, S. 410.

²⁾ Journal of Physiol., Vol. XVI, No. 1, p. 26, 1894.

³⁾ Malpighia, vol. VIII, 94, ref. i. d. Ztschr. f. wiss. Mikr. XI. 4. S. 539.

⁴⁾ Bot. Ztg, 1894, S. 245.

sei nichts als Xanthoproteinreaction, und eine Braunfärbung trete bei der Reduction nur auf, wenn die Schnitte nicht genügend ausgewaschen wären, die Nucleine reagierten überhaupt nicht mit Ammoniummolybdat, Reduction mit Braunfärbung sei auf Ammoniummolybdat zu beziehen, während phosphormolybdänsaures Ammon bei gleicher Behandlung eine grüne Färbung gäbe.

Was Raciborski anbetrifft, so ist seine Angabe, dass man nach Behandlung von Gewebsschnitten mit Ammoniummolybdat das letztere wieder völlig auswaschen könne, sicher nicht zu verallgemeinern. Ich habe die verschiedensten Gewebe (nur in Alkohol fixirt und gehärtet) 12 Stunden mit Ammoniummolybdat (nach der in Fresenius' «Quantitativer Analyse» gegebenen Vorschrift bereitet) behandelt und die feinen Schnitte (10—20 μ) tagelang in oft gewechseltem neutralen oder schwach salpetersauren Wasser ausgewaschen, ohne dass die Blaufärbung nach der Reduction vermindert wäre. Auch die Angabe, dass Braunfärbung auf Reduction von Ammoniummolybdat, Grünfärbung auf phosphormolybdänsaures Ammon zu beziehen sei, kann ich nicht bestätigen. In mikroskopischen Schnitten bekam ich fast nur blaue Reduction, bisweilen dicht daneben (ohne ersichtlichen Grund), mit allmählichem Uebergang eine schmutzig grüne Färbung. Es scheint hierbei sowohl das Mengenverhältniss von SnCl_2 zur Molybdänverbindung, wie auch die grössere oder geringere Dichtigkeit der Substanz mitzusprechen. Lockere flockige Niederschläge scheinen sich lieber braun zu reduciren, feste Brocken hingegen blau¹⁾. Auch im Reagenzrohr erhält man je nach Mengenverhältniss oder je nach dem die Reaction der Flüssigkeit stark oder schwach sauer ist, grüne, braune oder blaue Reduction, ganz gleich ob Phosphor vorhanden ist oder nicht. Was jedoch die Bedeutung der Reaction für die Beurtheilung des Phosphorgehalts angeht, so muss betont werden, dass

¹⁾ Die Braunfärbung beruht auf der Bildung von MoO_2 , zum Theil auch wohl auf weiter gehender Reduction, die Blaufärbung wird hauptsächlich durch Mo_3O_8 hervorgerufen. Näheres siehe b. Gmelin-Kraut, Anorg. Chemie II, S. 160—165.

die verschiedensten Eiweisskörper mit Ammoniummolybdat — mehr oder weniger lösliche — Verbindungen (durch Fällung aus Lösungen) geben, welche gut ausgewaschen nach energischer Reduction blaue und braune Färbung veranlassen. Diese Fällung wird aber nicht, wie man annehmen könnte, durch die Gegenwart von Phosphaten bewirkt.

Da sich die Eiweisspräparate, welche mir zu Gebote standen (unter ihnen auch ein nach Liliensfeld aus Thymus bereitetes Histon), als phosphorhaltig erwiesen, so versuchte ich mir zunächst ein phosphorfrees Präparat zu verschaffen. Ich stellte deshalb aus Thymus durch Ausschütteln mit Wasser Nucleohiston dar, fällte mit Essigsäure, zerlegte den Filterrückstand mit 0,3% HCl, fällte im Filtrat mit NH_3 das Histon, wusch es zur Entfernung der Nucleine tagelang mit $\frac{1}{10}$ norm. NaOH, filtrirte, wusch den Filtrerrückstand mit salzsaurem Alkohol, dann mit Alkohol bis zum Verschwinden der sauren Reaction und trocknete nach Behandlung mit Aether über H_2SO_4 . 0,25 gr. dieser mit grossen Verlusten gewonnenen Substanz gaben nach Veraschung mit Soda und Salpeter weder mit Ammoniummolybdat noch mit Magnesiamischung eine Phosphorreaction. Dennoch gab die klare Lösung dieses Histons in 0,3% HCl mit Ammoniummolybdat einen gelben Niederschlag, welcher tagelang in oft gewechseltem Wasser ausgewaschen sich durch SnCl_2 grünlich-dunkelbraun reduciren liess, ebenselbst durch Pyrogallol. Das letzte Waschwasser gab natürlich absolut keine Färbung auf Zusatz des Reductionsmittels. Eine Histonlösung, direct oder nach der Fällung mit HNO_3 mit SnCl_2 behandelt, blieb weiss. Ebenso liess sich der durch Ammoniummolybdat in einer essigsäuren Nucleinsäurelösung erzeugte Niederschlag nach gründlichem Auswaschen braun oder blau reduciren, nur musste ich hier mit salpetersaurem Wasser (20 Tropfen conc. HNO_3 auf 100 ccm. Wasser) auswaschen, da sich der Niederschlag im reinen Wasser etwa bei der fünften Waschung nicht wieder absetzte. Die schliessliche Färbung war jedoch bei weitem nicht so intensiv wie beim Histon.

Auch die Interzellulärsubstanz des Knorpels im Froschauge gibt schwache aber deutliche Blaufärbung (was Liliensfeld

in Abrede stellt). Meine Ansicht ist demnach die, dass sowohl P-haltige Substanzen, darunter Nucleinsäure und Nucleine, als auch viele Eiweisskörper mit Ammoniummolybdat in salpetersaurer Lösung Verbindungen geben, welche in neutralem oder salpetersaurem Wasser unlöslich sind und sich durch Reduction blau, grün oder braun färben lassen. In Alkohol, Oel, Canadabalsam lassen sich diese Präparate gut aufheben. Da ziemlich dünne Schnitte (ca. 15 μ) selbst nach 5stündigem Kochen mit Alkohol abs. am Rückflusskühler keine Verminderung der Blaufärbung nach Behandlung mit Ammoniummolybdat und $ZnCl_2$ erkennen liessen, so nehme ich an, dass Lecithine nicht wesentlich an der Reaction betheiligt sind. Wohl aber kann der Ausfall der Reaction beeinflusst werden durch vorausgeschickte Behandlung der Schnitte mit Alkalien und Säuren (z. B. HCl 0,3%, schw. Essigs. u. a.). Hierdurch werden eben die Eiweisskörper theils gelöst, theils verändert, ebenso wie durch $Ba(OH)_2$ oder Na_2CO_3 , von denen Liliensfeld angibt, dass sie die Phosphorsäure und die Nucleinsäure abspalten und reactionsfähiger machen sollten. Kaltes Barytwasser fällt Nucleinsäure, und Soda löst frisch gefällte Nucleinsäure als solche, während längere Zeit mit Alkohol behandelte Nucleinsäure widerstandsfähiger wird. Das Molecül des Eiweisses kann aber wohl durch diese Behandlung etwas gelockert und reactionsfähiger gemacht werden. Die Schärfe der Zeichnung leidet jedoch darunter.

Wenn Liliensfeld und Monti zellenreiche Schnitte von Lilien und Muskelstücke in Ammoniummolybdat brachten, den einen Theil mit Wasser, den zweiten mit NH_3 auswaschen und dann nur in den ersteren eine Reductionsfärbung erhielten, so ist zu bemerken, dass auch Eiweissmolybdat in NH_3 löslich ist, dass also die Autoren nicht zu dem Schlusse berechtigt sind, es habe sich um phosphormolybdänsaures Ammon gehandelt.

Was übrigens die «Molybdänreaction», richtig angewendet, zu leisten vermag, sei dadurch illustriert, dass ich in

Präparaten vom Salamanderhoden, welche nur in Alkohol gehärtet waren, auf das Deutlichste die achromatische Spindel und die Genese des Mittelstückes, genau wie dies von Hermann angegeben ist, verfolgen konnte¹⁾. Nur behalte man im Auge, dass man dann keineswegs nur phosphorhaltige Substanzen gefärbt hat!

Zur Technik der Methode kurz noch Folgendes: Ich bringe die 10—20 μ dünnen Celloidinschnitte aus 70 proc. Alkohol in ein zur Hälfte mit salpetersaurer Ammoniummolybdatlösung beschicktes Probirröhrchen und lasse 15 St. stehen, dann wird die Lösung abgegossen, wobei die leicht-gelblich gefärbten Schnitte auf dem Boden liegen bleiben. Nun giesse ich destill. oder salpeters. Wasser auf, setze den Finger auf und drehe verschiedene Male um, lasse dann wieder eine Zeit lang stehen, giesse ab und wiederhole diese Procedur innerhalb einiger Stunden 5—6 mal. Dann kommen die Schnitte in eine Lösung von Zinnchlorür, welche durch Auflösung des käuflichen Präparates in heissem Wasser bereitet ist, für 10—15 Secunden. Man kann auch alkoholische 5% SnCl_2 -Lösung verwenden, dann wird in 96 proc. Alkohol gewaschen, in Alk. abs. entwässert und nach Origanumöl in Canada eingeschlossen.

Herrn Professor Kossel danke ich auch an dieser Stelle für sein freundliches Interesse an dieser Arbeit.

¹⁾ Arch. f. mikr. An., 34, 89 II.