

## Versuche zur Haltbarmachung der Phloroglucin-Salzsäure-Reaktion

Von JOSEF KISSER und ANTON STEININGER

Da die gebräuchlichen Holzreaktionen (Phloroglucin-HCl, Anilinsulfat, Mäule) sehr charakteristische Färbungen ergeben, erscheint bei vergleichenden Untersuchungen ihre unveränderte Erhaltung, wenigstens durch einige Zeit hindurch, sehr wünschenswert. Aus diesem Grunde hat sich seinerzeit mit dieser Frage LOHWAG (1936) näher beschäftigt, mit dem Ergebnis, daß sich nur die Farbreaktion mit Anilinsulfat befriedigend erhalten läßt. Dagegen verblasen mit Phloroglucin-HCl behandelte Schnitte in Glycerin schon nach kurzer Zeit, und auch auf dem Objektträger eingetrocknete Schnitte verlieren ihre Färbung ziemlich rasch. Wohl behalten nach der Reaktion mit Eisessig befeuchtete und nach Austrocknung in Kanadabalsam eingeschlossene Schnitte von Nadelhölzern durch längere Zeit hindurch die kräftige Rotfärbung, aber nach sechs Monaten sind sie ebenfalls schon stark verblaßt und erscheinen nur noch zart rosa angefärbt; dagegen versagte dieser Weg bei Schnitten durch Eichenholz. Auch in Schnitten, die nach Ausführung der Reaktion in ein Gemisch von 25 ccm Glycerin, 0,01 g Phloroglucin und 3 Tropfen konz. HCl eingeschlossen wurden, hielt sich die Färbung auch in verschlossenen Präparaten nur wenige Tage.

Beim Studium des mikroskopischen Gefüges von Holzfaserplatten war es nun notwendig, von Plattenstücken größere mikroskopische Schnitte ohne Veränderung der gegenseitigen Lage der einzelnen Fasern herzustellen. Dies konnte durch Einbettung in Zelloidin erreicht werden. Für die Anfertigung von Mikrophotos war aber eine entsprechende Anfärbung der Fasern notwendig, wobei sich aber sehr störende Mitfärbungen des Zelloidins einstellen, da dieses eine Reihe von Farbstoffen mit großer Kraft festhält (vgl. KISSER, 1928). Dagegen entsprach die Anfärbung mit Phloroglucin-HCl unseren Bedürfnissen, nur war gleichzeitig noch eine stärkere Aufhellung der Präparate notwendig. Da zur Durchführung dieser Reaktion keineswegs konzentrierte HCl erforderlich, sondern nach SCHINDLER (1931) 25%ige HCl am vorteilhaftesten ist, behandelten wir die im Schälchen mit der Phloroglucin-Lösung vorbehandelten Schnitte mit Glycerin, dem eine entsprechende Menge HCl zugesetzt war. In diesem Gemisch zeigten die Holzfasern auch nach mehreren Wochen immer noch unverändert ihre kirschrote Farbe, während sie in reinem Glycerin rasch verblaßten. Hier schien nun ein aussichtsreicher Weg, der weiter verfolgt wurde, um wenigstens durch einige Zeit hindurch die Phloroglucin-HCl-Färbung unverändert erhalten zu können.

Schnitte von Hölzern (*Pinus nigra*, *Fagus silvatica*), ferner von krautigen Pflanzenteilen (Wedelstiele von *Pteridium aquilinum*, Blattstiele von *Phoenix* sp., Stengel von *Pelargonium zonale*, Blattstiele von *Petasitis officinalis* u. a.) wurden zunächst mit Phloroglucin-HCl behandelt und hierauf in Glycerin-HCl-Gemische wechselnder Zusammensetzung (2 1, 5 1, 10 1, 20 1 und 50 1) übertragen. Die eine Reihe der Präparate blieb ohne Verschuß, bei der anderen wurde das Deckglas mit Venetianer-Terpentin umschlossen. Diese Präparate wurden durch mehrere Monate hindurch laufend beobachtet. Die Schnitte von Kiefernholz zeigten in dem verschlossenen Glycerin-HCl-Gemisch 2 1 auch nach vier Monaten fast unverändert die kräftige kirschrote Farbe, während die nicht verschlossenen Schnitte merklich verblaßt und orangerot verfärbt waren. Bei der Buche ist die Farbreaktion gegenüber Kiefernholz an sich wesentlich schwächer; nach vier Monaten war im verschlossenen Präparat der Farbton zwar noch kräftig, aber mehr orangerot, im unverschlossenen dagegen stark abgeblaßt und orange gelblich. An den Wedelstielen von *Phoenix* war nach vier Monaten in den verschlossenen Präparaten die leuchtend-kirschrote Farbe unverändert geblieben, dagegen waren in den nicht verschlossenen die mechanischen Elemente fast völlig ausgeblaßt und nur die dichteren Holzteile wiesen noch eine rote Farbe auf. Ganz analog verhielten sich die Schnitte durch die Wedelstiele von *Pteridium*.

Werden an Stelle des Glycerins andere organische Solventien verwendet, so sind die Ergebnisse viel weniger befriedigend. In einer Mischung von Äthanol und HCl 2 : 1 weisen Fichtenholzspäne nach vier Monaten makroskopisch eine dunkelrotbraune Farbe auf, mikroskopisch erscheinen die Tracheidenwände kräftig orangerot gefärbt. In reinem Äthanol war die Farbe nach dieser Zeit leuchtend orangerot bzw. orange-gelb. In einem Methanol-HCl-Gemisch 2 : 1 hatten die Späne nach vier Monaten eine dunkelschwarzbraune, fast schwarze Farbe angenommen, mikroskopisch zeigten die Tracheidenwände eine kräftige braune Farbe. In einem Diazetin-HCl-Gemisch 2 : 1 verhielten sich die Fichtenholzspäne wie in dem Methanolgemisch.

Die Versuche mit Glycerin-HCl-Gemischen hatten gezeigt, daß die Farberhaltung nur dann gewährleistet ist, wenn Salzsäure in einer gewissen Konzentration zugegen ist und diese auch dauernd erhalten bleibt, weshalb auch nichtverschlossene Präparate sehr rasch ihre Farbe ändern und verblassen. Es schien daher zweckmäßig, an Stelle der flüchtigen Salzsäure eine nichtflüchtige Säure zu versuchen, und zwar am zweckmäßigsten Schwefelsäure.

Nach Ausführung der Phloroglucin-HCl-Reaktion in üblicher Weise wurden Fichtenholzspäne in ein Glycerin-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Gemisch 5 : 1 eingelegt. Nach drei Monaten waren sie unverändert leuchtend kirschrot, unter dem Mikroskop zeigten sich die Mittellamellen dunkelrot, die Sekundärwandschichten des Spätholzes intensiv kirschrot und die Wände der Frühholztracheiden kirschrot gefärbt. Nach weiteren drei Monaten war das leuchtende Rot zwar noch immer erhalten, ließ aber gegenüber frisch behandelten Schnitten einen schwach bräunlichen Stich erkennen. Schnitte von Buchenholz zeigten nach 14 Wochen ebenfalls noch die leuchtend rote Farbe, aber in gleicher Weise einen schwach bräunlichen Stich. Völlig unverändert erwiesen sich die Holzelemente im Wedelstiel des Adlerfarnes sowie im Blattstiel der Pestwurz, dagegen schwächer tingiert und stärker bräunlich verfärbt im Wedelstiel der Dattelpalme und im Stengel der Pelargonie. Dabei verhielten sich, wie zu erwarten war, verschlossene und unverschlossene Präparate völlig gleich, da ein Verdunsten der H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> nicht erfolgt. Aus diesem Grunde ist dort, wo eine vorübergehende Erhaltung der Phloroglucin-HCl-Reaktion angestrebt wird, einem Glycerin-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Gemisch der Vorzug zu geben.

Bei vorher mit Phloroglucin-HCl behandelten und dann in Glycerin-HCl 2 : 1 eingelegten Holzsnitten begann sich nach einiger Zeit das Einschlußmittel ganz schwach rötlich zu verfärben und es erweckte den Anschein, als ob ein Teil des Reaktionsproduktes in Lösung gehen würde. Dies ist aber in Wirklichkeit nicht der Fall, sondern nach einem freundlichen Hinweis von Priv.-Doz. Dr. K. KRATZL (I. Chemisches Institut der Universität Wien) dürfte es sich hierbei um ein aus der Einwirkung der Salzsäure auf die Zellulose resultierendes Produkt handeln. Wir haben daher auf sein Anraten Sulfitzellulose, ferner gereinigte Baumwolle in größerer Menge in Glycerin-HCl 2 : 1 eingelegt und tatsächlich gingen auch aus diesen ligninfreien Materialien nach kurzer Zeit rötlichbraun gefärbte Produkte in Lösung.

### Z u s a m m e n f a s s u n g

Es wurde gezeigt, daß es grundsätzlich möglich ist, die Phloroglucin-HCl-Reaktion durch längere Zeit unverändert zu erhalten, wenn man z. B. die gefärbten Schnitte in ein Glycerin-HCl-Gemisch 2 : 1 überträgt und das Abdunsten der Salzsäure durch Verschuß der Präparate verhindert. In gleicher Weise ist auch die Farberhaltung in einem Glycerin-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Gemisch 5 : 1 möglich; ein Verschuß der Präparate ist hier nicht notwendig. Die einzelnen Pflanzenobjekte verhalten sich hinsichtlich der Dauer der Haltbarkeit der Reaktion verschieden.

It has been made clear that basically it is possible to preserve phloroglucin HCl reaction for a long period without change if, for instance, the stained sections are placed in a mixture of glycerine and HCl (2 : 1) and evaporation is prevented by sealing. In the same way it is also possible to maintain colour in a glycerine mixture of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 : 1. Sealing is not necessary in this instance. Individual plant specimens react differently according to the length of the period at which reaction can be maintained.

### Literatur

*Kisser J.*, Zur Färbung kutinierter Zellulosemembranen. Z. wiss. Mikrosk. **45** (1928): 163—171. — *Lohwag K.*, Versuche zur Haltbarmachung der gebräuchlichsten Holzreaktionen. Mikrochem., Molisch-Festsch. (1936): 314—318. — *Schindler H.*, Kritische Beiträge zur Kenntnis der sogenannten Holzreaktionen. Z. wiss. Mikrosk. **48** (1931): 289—319.

(Aus dem Histologisch-Embryologischen Institut der Universität Wien)

## Über die Beeinflussung der Reifung des Delafieldschen Hämatoxylingemisches durch Ultraschall

Von WALTER BEJDL

Hämatoxylinlösungen, die in unterschiedlichen Zusammensetzungen angegeben werden, haben alle, bevor sie zum Färben zu gebrauchen sind, eine verschieden lange Zeit der Reifung durchzumachen. Diese Periode muß sogar, wie bei dem von HELD angegebenen Farbstoff, auf ein Jahr ausgedehnt werden. Eine der gebräuchlichsten Farbmischungen in der von DELAFIELD angegebenen Zusammensetzung benötigt eine Reifungszeit von etwa einem Monat. Schon seit jeher war man bestrebt, diese lange Wartezeit abzukürzen, um die Farbstofflösungen womöglich gleich nach der Bereitung zu Färbungen gebrauchen zu können.

Die Analyse des Reifungsvorganges (KRAUSE) hat ergeben, daß es sich dabei um einen Oxydationsvorgang handelt, bei welchem aus dem Hämatoxylin Hämatein entsteht, welches erst in Verbindung mit Metallsalzen färbt. Zusätze, wie Ammoniumalaun, geben dann der Lösung die Fähigkeit, die spezifisch geladenen Teilchen der Zelle zu färben (MASAJI SEKI). Auf Grund dieser Angaben wurde nun versucht, frisch bereitete Farblösungen künstlich der Reifung zuzuführen. Der Oxydationsvorgang wurde mittels einer Durchperlung der jungen Lösungen mit Sauerstoff versucht und auch erreicht. Die Farblösung war nach einigen Tagen verwendungsfähig. Als Oxydationsmittel wurde außerdem zum Beispiel in der von HANSEN angegebenen Hämatoxylinlösung Kaliumjodat verwendet, es kann aber auch Kaliumpermanganat sowie Wasserstoffsuperoxyd als Oxydans herangezogen werden.

Ich habe nun versucht, Ultraschallwellen auf junge Farblösungen einwirken zu lassen und dabei ebenfalls eine Beschleunigung des Reifungsvorganges beobachten können.

Die Versuchsanordnung war etwa folgende: In eine Epruvette mit einem plan geschliffenen unteren Ende wurde eine ungefähr 5 cm hohe Farbstoffsäule gegeben und in Öl über einen Quarz gelagert. Der Quarz hatte eine Eigenfrequenz von 870 kHz bei 4 Watt pro Quadratzentimeter. Die Beschallung wurde im Physikalischen Institut bei Frau Professor SEIDL durchgeführt und ich erlaube mir, meinen Dank für das Entgegenkommen sowie für die technischen Anleitungen während der Arbeiten auszusprechen. Die Lösungen wurden nun verschieden lange beschallt und anschließend sofort zu einer Färbung verwendet. Als Kontrolle diente eine Farblösung, die zur gleichen Zeit bereitet, jedoch nicht den Ultraschallwellen ausgesetzt wurde. Ich habe frisch angesetzte Farblösungen 2, 4, 6, 8, 10 sowie 15 und 20 Minuten beschallt, um durchlaufende Serien zu erhalten.

# ZOBODAT - [www.zobodat.at](http://www.zobodat.at)

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Mikroskopie - Zentralblatt für Mikroskopische Forschung und Methodik](#)

Jahr/Year: 1950

Band/Volume: [5](#)

Autor(en)/Author(s): Kisser Josef, Steininger Anton

Artikel/Article: [Versuche zur Haltbarmachung der Phloroglucin-Salzsäure-Reaktion. 39-41](#)