Ueber die Metachromasie des Toluidinblaus.

Von Robert Schwarz und Erika Herrmann (Freiburg i. B.)

(Eingegangen am 25. Juni 1922.)

Der Farbstoff Toluidinblau gehört heute zu den in der Technik der histologischen Färbung am häufigsten benützten. Bei seiner Verwendung in diesem Sinne zeigt sich in ausgeprägtem Maße die Erscheinung der Metachromasie. Er erschien daher geeignet zu einer Untersuchung über das Wesen dieser eigentümlichen, in ihrer theoretischen Deutung noch umstrittenen Erscheinung.

Ohne auf die gesamte über Metachromasie handelnde Literatur einzugehen, sei hier nur auf die umfangreiche und zu interessanten Ergebnissen führende Studie von Wo. Ostwald's über das Kongorubin¹⁾ hingewiesen, als deren im Sinne der vorliegenden Untersuchung wichtigstes Resultat erwähnt sei, daß die Ursache der Farbänderung auf eine Aenderung des Dispersitätsgrades, mithin auf kolloidchemische Vorgänge zurückgeführt wird.

Der Grundgedanke für die vorliegende Untersuchung war, den Farbstoff in seinem Verhalten gegenüber chemisch möglichst einfach zusammengesetzten, anorganischen Substanzen mit variablem, aber eindeutig bestimmtem Dispersitätsgrad zu prüfen, um auf diese Weise einmal den Ursachen der Metachromasie näherzukommen, und weiter Rückschlüsse auf die kolloidchemische Beschaffenheit der organischen, anatomisch interessierenden Zellsubstanzen ziehen zu können.

A. Allgemeine Eigenschaften des Farbstoffs.

Das von uns benützte Toluidinblau stammte von Grüber und zeichnete sich durch Reinheit betreffs Beimengung anderer Farbstoffe aus. Seiner Zusammensetzung nach ist der Farbstoff das Chlorzinkdoppelsalz des Dimethyltoluthionins. Der anorganische Bestandteil des Farbstoffs wurde zu 11,5 Proz. ermittelt. Auf eine Reinigung durch Dialyse wurde verzichtet, da histologische Färbungen gezeigt hatten, daß dialysierte und nicht dialysierte Lösungen sich färberisch gleich verhalten.

Von allgemeinen Eigenschaften des Toluidinblaus ist seine starke Oberflächenaktivität hervorzuheben. Eine konzentrierte Lösung des Farbstoffs liefert beim Schütteln einen starken,

violett gefärbten Schaum. Läßt man eine Lösung längere Zeit stehen, so entwickeln sich an der Oberfläche rot schillernde Häutchen, die an Konsistenz mit Konzentration und Alter zunehmen. Die relative Oberflächenspannung, gemessen mit der stalagmometrischen Methode von J. Traube ergab bei einer 0,5prozentigen Lösung den Wert 0,95 (Wasser = 1).

Zur annähernden Ermittlung des Dispersitätsgrades wurde der Farbstoff der Dialyse, Ultrafiltration und Diffusion unterworfen. Eine 0,01 molare wässrige Lösung von Toluidinblau zeigt bei Anwendung von Dialysatoren aus Kollodiummembran (hergestellt durch zweimaliges Ausgießen von Extraktionshülsen mit 3prozentigem Kollodium) nach 48 Stunden eine geringe, wenn auch deutlich wahrnehmbare Blaufärbung des Außenwassers. Eine alkoholische Lösung in gleicher Konzentration ließ die Außenflüssigkeit nach Ablauf derselben Zeit stärker gefärbt erscheinen. Nach Verlauf von einer Woche war noch kein Ausgleich eingetreten.

Die Diffusion des Farbstoffes in 5prozentiger Gelatine lieferte folgendes Ergebnis: Die Diffusionsgeschwindigkeit in Konzentrationen von 0,2 bis 0,002 Proz. beträgt 6 mm pro 24 Stunden bzw. 9 mm, da eine Diffusion in zwei Zonen erfolgt. Die 9 mm-Zone ist bedeutend heller als die 6 mm-Zone gefärbt, jedoch sind beide Zonen rein blau, was an mit dem Gefriermikrotom hergestellten Schnitten untersucht wurde.

Als Erklärung für das Auftreten zweier Zonen kann man in Analogie mit den Ostwaldschen Ergebnissen am Kongorubin annehmen, daß es sich hierbei um eine Fraktionierung eines polydispersen Systems handelt. Kontrollversuche mit Diffusionen in horizontaler Richtung ergaben dasselbe Resultat.

An den Lösungen mit niedrigster Konzentration trat weiterhin folgende Erscheinung auf: War der Farbstoff eine gewisse Zeit diffundiert, wobei die Trennung in zwei Zonen stets erhalten blieb, so trat plötzlich an der Grenzschicht Farblösung — Gelatine ein farbloser Ring von 3—4 mm auf. Von diesem Zeitpunkt an trat kein Farbstoff mehr in die Gelatine ein, während der schon diffundierte Teil, in seine zwei Zonen getrennt, weiter wanderte. Vor-

¹⁾ Wo. Ostwald, Kolloidchem. Beih. 10 (1919).

sichtiges Umschütteln, das den Farbstoff wieder in Berührung mit der Gelatine brachte, hatte keinen Erfolg. Nach einigen Stunden hatte sich der farblose Ring wieder gebildet. Erst nach einer Woche begann nach Umschütteln der Lösung eine erneute Diffusion.

Bei der Ultrafiltration wurden Filter mit 3prozentigem Kollodium, hergestellt nach den Angaben von Wo. Ostwald, verwendet. Die Farbstofflösung war 0,002prozentig und zeigte bei kolorimetrischen Messungen (im Kolorimeter nach Autenrieth-Königsberger) im Vergleich zur Keilflüssigkeit den Skalenwert 10. Nach der Ultrafiltration war das Filtrat zwar sehr schwach bläulich gefärbt, jedoch ließ sich der verwendeten Keilflüssigkeit gegenüber kein Skalenwert mehr feststellen.

Dasselbe Verhalten zeigten Lösungen, denen auf 5 ccm Farbstofflösung 1 ccm nHCl zugesetzt wurde. Auf Zusatz von 1 ccm nNaOH zu 5 ccm Farblösung schlug der Farbton nach rot um. Das Filtrat war schwach, aber rein rötlich gefärbt. Der Farbstoff auf dem Filter zeigte eine tiefschwarzblaue Färbung, also nach Entziehung der OH-Ionen einen Umschlag nach blau. Hierbei sei darauf hingewiesen, daß jede Ausflockung stets nach rot erfolgt, diese aber schon durch eine Verdünnung mit Wasser nach blau umschlägt. Aus den dispersionsmessenden Methoden ergibt sich zusammengefaßt, daß die wässrige Lösung des Toluidinblaus den Farbstoff als ein Dispersoid enthält, dessen Dispersitätsgrad in der Mitte zwischen molekular- und kolloid-gelöstem System steht, bzw. ein polydisperses System ist, das sowohl kolloide wie auch molekulardisperse Teilchen sowie deren Uebergänge aufweist.

Die Versuche über die elektrischen Eigenschaften ergaben folgende Resultate:

Eine 0,01prozentige Lösung wurde im Ueberführungsapparat der Kataphorese bei einer Spannung von 220 Volt ausgesetzt. Nach 15 Stunden zeigte sich eine deutliche Trennung der beiden Flüssigkeitssäulen. Der Kathodenschenkel wies eine tief rotblaue Färbung, der Anodenschenkel eine rein hellblaue Farbe auf. Beide Flüssigkeiten wurden getrennt aufgefangen und ihre Farbintensität kolorimetrisch gemessen. Es ergaben sich folgende Skalenwerte:

Ursprüngliche Lösung 10
Kathodenflüssigkeit . 10
Anodenflüssigkeit . . 78

Beim Ablassen der Lösung zeigte sich die Wädhung des Kathodenschenkels und die Kathode selbst mit einer Schicht roten Farb-

stoffes überzogen, während der anodische Schenkel frei von Niederschlag war. Nachdem noch ein zweiter gleichartiger Versuch mit denselben Ergebnissen angestellt worden war, wurde die erhaltene Kathodenflüssigkeit aus beiden Versuchen abermals der Kataphorese unterworfen. Auch hier zeigte sich wieder starke Aufhellung im Anodenschenkel, Farbvertiefung sowie Farbstoffniederschlag im Kathodenschenkel. In derselben Weise wurde die aus Versuch 1 und 2 gewonnene Anodenflüssigkeit weiter behandelt. Nach 30 stündiger Kataphorese ergaben sich hier folgende Skalenwerte:

Anodenflüssigkeit . . 95
Kathodenflüssigkeit . 82

Nach weiteren 15 Stunden war unter entsprechender Zunahme der Farbintensität im Kathodenschenkel völlige Entfärbung des Anodenschenkels eingetreten. Die schwach sowie stark angesäuerte Lösung zeigte keine Umkehr des Wanderungssinnes. Im Kathodenschenkel trat ebenfalls eine Vertiefung des Farbtones auf, aber die Farbstoffausscheidung blieb aus. Der Anodenschenkel zeigte stark aufgehellt türkisblaue Farbe und konnte deswegen kolorimetrisch nicht gemessen werden.

Die alkalische Lösung — hergestellt durch Zusatz von 3 ccm n100 NaOH zu 70 ccm 0,01prozentiger Lösung — zeigte nach 17 stündiger Kataphorese folgendes Ergebnis: Kathodenflüssigkeit trübe rötlich mit starker Ausflockung. Die Anodenflüssigkeit ergab kolorimetrisch bestimmt den Skalenwert 85. Vergleicht man diesen Wert mit den im ersten und zweiten Versuch gefundenen Zahlen, so zeigt sich, daß die Wanderungsgeschwindigkeit trotz des Elektrolytzusatzes nicht geändert worden ist. Eine Prüfung der filtrierten Lösung mit Phenolphthalein ergab, daß die rötlich gefärbte Kathodenflüssigkeit stark alkalisch war, während die blaue Anodenflüssigkeit keine Alkaleszenz erkennen ließ. Hier zeigte sich also dasselbe Ergebnis wie bei der Ultrafiltration, nämlich nach Herabsetzung der OH-Ionenkonzentration eine Verschiebung der Farbe nach blau. Aus diesen Versuchen geht hervor, daß das Toluidinblau ein positiv geladenes Kolloid ist, dessen Wanderungsgeschwindigkeit oder Ladungssinn durch Zusätze nicht beeinflusst wird.

B. Anfärbungen mit Toluidinblau.

Im Sinne der oben angedeuteten Methodik wählten wir zunächst das Kieselsäuregel.

welches sich nach Schwarz und Liede²⁾ in zwei kolloidchemisch verschiedenen Formen (a- und b-Gel) herstellen läßt. Beide werden durch Einleiten von SiF_4 in Wasser erhalten, das a-Gel bei 0°, das b-Gel bei 100°. Von den verschiedenen Eigenschaften interessiert hier, daß das b-Gel gröber dispers als das a-Gel ist.

Es wurden Gele mit verschiedenem Wassergehalt verwendet, zunächst a-Gele mit 92, 83 und 9 Proz. H_2O . Kleine Proben der Gele wurden im Reagenzglas mit einer 0,002-prozentigen Farbstofflösung kräftig durchgeschüttelt und dann 24 Stunden stehen gelassen. Alle a-Gele zeigten sich nach dem Abgießen der Lösung rein blau gefärbt. Mit fallendem Wassergehalt des Gels war eine geringe Abnahme der Färbung festzustellen. Drei b-Gele von verschiedenem Ursprung und Wassergehalt (Nr. 1 mit 90 Proz. H_2O , Nr. 2 und 3 mit 10 Proz. H_2O) färbten sich beim Schütteln mit Toluidinblau sofort rot und zeigten diese Färbung auch noch nach 24 Stunden. Da der Ladungssinn beider Gelarten derselbe ist und auch eine Verschiedenartigkeit in bezug auf adsorbierte Ionen nicht in Frage kommt, so ist für das Auftreten der Metachromasie lediglich der verschiedene Dispersitätsgrad des Adsorbens verantwortlich zu machen. Es sei in diesem Zusammenhange auf Versuche von Haller³⁾ und Wo. Ostwald⁴⁾ hingewiesen, die in Lösungen von Kongorubin ein Stück Kattun sowie fein zerfaserten Kattun anfärbten. Hierbei zeigte sich, daß das grobe Stück rot, der zerzupfte Teil jedoch blauviolett, d. h. in der Ausflockungsfarbe des Kongorubins gefärbt war. Dieselbe Erscheinung trat bei der Anfärbung von in gleicher Weise behandeltem Fließpapier auf. Haller führt die Erscheinung in der Hauptsache auf Oberflächenvergrößerung zurück, während Wo. Ostwald als zweites Moment die leichtere Quellbarkeit des zerzupften Gewebes heranzieht. Weiterhin sei hier bemerkt, daß ähnliche Erscheinungen bei der histologischen Färbung der Knorpelgrundsubstanz auftreten. Beim differenzierten Knorpel färbt sich der die Zelle ringförmig umgebende Hof mit basischen Farbstoffen stark metachromatisch, also bei Toluidinblau rot, gegenüber den anderen sich blau färbenden Teilen. Hier

hat Schaffer⁵⁾ nachgewiesen, daß dieser metachromatisch gefärbte Hof, der bei Dunkelfeldbeleuchtung Doppelbrechung zeigt, lockerer gebaut ist als die zwischen den Höfen gelegene Interterritorialsubstanz.

Nach der Kieselsäure wurde die bekanntlich ebenfalls in a- und b-Form auftretende Zinnsäure zur Anfärbung herangezogen. Die a-Zinnsäure, einmal durch Fällung mit Ammoniak, das andere Mal mit Natronlauge aus Zinntetrachlorid hergestellt, zeigte in beiden Fällen reinblaue Anfärbung. Wurde dasselbe Präparat durch schwaches Glühen in Metazinn-säure umgewandelt, so färbte es sich rot. Durch Abrauchen von Zinn mit Salpetersäure direkt gewonnene Metazinn-säure zeigte ebenfalls gegen 0,01-prozentige Farbstofflösung geprüfte Rotfärbung.

Bariumsulfat als Adsorbens. Es wurden fünf verschiedene Präparate angewendet: I. Aus Bariumchlorid und Schwefelsäure bei 20° erhalten, mit überschüssiger H_2SO_4 gefällt. II. Ebenso, aber mit BaCl_2 im Ueberschuß. III. Wie I aber bei 100°. IV. Wie II bei 100°. V. Ein Präparat von Merck.

III und IV reagierten Toluidinblau gegenüber gar nicht. I, mit überschüssiger H_2SO_4 gefällt, zeigte deutliche Rotfärbung, II wurde nicht angefärbt. Da in beiden Fällen mit gleichen Konzentrationen gefällt wurde, war eine Verschiedenheit der Dispersität unwahrscheinlich, und lediglich ein Unterschied in der Art der adsorbierten Ionen vorhanden. Die Aufladung durch die Adsorption der negativen SO_4^{--} -Ionen begünstigt mithin die Aufnahme des Farbstoffes, während die mit positive Ba^{++} -Ionen beladene Oberfläche die Anfärbung verweigert. Das Präparat V von Merck gab in frischem Zustande keine Reaktion, nach starkem Glühen (Verringerung des Dispersitätsgrades) trat Rotfärbung auf. Dieselbe Erscheinung zeigte auch das Präparat IV, welches ebenfalls nach dem Glühen rötliche Färbung annahm.

Eine geringe Anfärbung war auch bei Aluminiumhydroxyd, aus Aluminiumsulfatlösung durch Fällung mit NH_3 hergestellt, nachzuweisen. Sie war bei dem frischen Präparat blau, beim geglühten rot.

Magnesium-Ammonium-Phosphat, in der bei der quantitativen Analyse üblichen Weise in der Hitze gefällt, wurde nach gutem Auswaschen a) im Trockenschrank bei 105° ge-

²⁾ Schwarz u. Liede, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 53, 1680 (1920); Koll.-Zeitschr. 28, 77 (1921).

³⁾ Haller, Koll.-Zeitschr. 27, 188 (1920).

⁴⁾ Wo. Ostwald, loc. cit.

⁵⁾ Schaffer, Lehrb. d. Histologie u. Histogenese (1922), 167.

trocknet, b) schwach, c) vor dem Gebläse ge-
glüht. Alle drei Präparate färbten sich meta-
chromatisch, und zwar mit steigender Intensität
von a nach c.

Zum Schluß sei noch eines Versuches mit
Eialbumin Erwähnung getan. Es handelte
sich um ein mehrere Jahre altes Präparat,
welches zum Teil durch Alterungsprozesse in
eine in physiologischer Kochsalzlösung unlös-
liche Modifikation übergegangen war. Wurde
der gelöste Anteil aus der Kochsalzlösung aus-
gefällt, mit Wasser gut ausgewaschen, so färbte
sich dieser Teil mit Toluidinblau rein blau,

während der ungelöste Bestandteil sich zunächst
rötlich färbte, dann aber von blau überdeckt
wurde. Letzteres könnte wohl auf einer Quel-
lung der grobdispersen Teilchen mit nachfol-
gender Farbstoffdiffusion beruhen.

Als Resultat aus den geschilderten Anfär-
bungsversuchen geht klar hervor, daß die
Ursache der Metachromasie in erster Linie auf
eine Verschiedenheit des Dispersitätsgrades des
den Farbstoff aufnehmenden Mediums, in zwei-
ter Linie auf den durch Ionenadsorption be-
stimmten Ladungszustand der Oberfläche zurück-
zuführen ist.

Kolloide Phosphate.

Von Carl Elschner.

(Eingegangen am 22. Mai 1922.)

(Mellon Institute of Industrial Research, Universität Pittsburgh.)

Auf einer Forschungsreise, die ich vom
Februar an in die Fanning-Gruppe der Südsee
unternahm, habe ich eingehende Untersuchungen
über die außerordentlich interessante Geologie
der Washington-Insel, die etwa 75 Meilen ent-
fernt von Fanning liegt, unternommen und be-
sonders die Bildung eines Süßwassersees und
drei großer Torfmoore auf einer reinen Korallen-
insel in den Tropen studiert. Die Torfmoore
liegen auf alten Sandbänken; durch Infiltration
in dem unterliegenden, aragonitischen Korallen-
sand ist derselbe in eine feinschlammige Masse
übergegangen, die merkwürdigerweise — zweifel-
los ein sekundäres Produkt — Kalzitkriställchen
enthält.

Eigenartig ist die Bildung eines Tones,
der nicht aus Silikaten besteht, sondern die
Zusammensetzung eines an organischer Substanz
reichen Trikalziumphosphats (neben zwei-
basischem phosphorsauren Kalk) hat.

Dieser Phosphat-Ton ist noch immer in
Neubildung begriffen; die Exkremente der zahl-
reichen Seevögel werden vom Wasser des Süß-
wassersees aufgenommen und gelöst; die außer-
ordentlich verdünnte Lösung von Oxalaten und
Phosphaten des Kalks und Ammoniaks haben
ein flockiges, sehr wasserhaltiges Phosphat mit
79—84 Proz. phosphorsauren Kalk auf Trocken-
substanz berechnet ausgeschieden, das einen
Teil des Bodens, besonders aber in dicker
Schicht die Wände resp. Ufer des Sees umgibt,
und ein wasserundurchlässiges Becken bildet,
welches das Wasser am Abfluß in den Ozean
durch Versickern verhindert. Der einzige Ueber-
lauf des Sees liegt ca. 4—5 Fuß höher als der
Ozean, und das braun gefärbte Wasser ist weit-

hin auf dem Meere sichtbar. Ich habe in
meinem Buche „Korallogene Phosphat-Inseln“
(Lübeck 1913) die Umsetzungen, die sich bis
zur Bildung von Guanophosphaten vollziehen,
beschrieben. Dieses Vorkommen eines kolloiden,
quellbaren, sehr plastischen Phosphates ist
äußerst interessant; der Phosphat-Ton trocknet
und schrumpft resp. quillt auf; — wahrscheinlich
kann man die Quellung auffassen als eine Lö-
sung von Wasser in dem quellbaren Phosphat,
indem die Moleküle des Wassers in den Raum
zwischen die Phosphat-Moleküle gepresst wer-
den; an einzelnen Stellen ist der Ton außer-
ordentlich weich, überall aber plastisch. Die
Moleküle des Tri- und Dikalziumphosphates sind
also gewissermaßen das Skelett des Tonbreies.

Die Quellungsfähigkeit des Phosphat-Tons
nimmt ab, wenn das Gefüge des Skeletts dichter
wird; dieses kann durch verschiedene Ursachen
hervorgerufen werden:

1. Durch Auslaugen des Dikalziumphosphates,
Bildung von gelöstem Monokalziumphosphat
und ausgeschiedenem Trikalziumphosphat und
von Eisenoxyd- und Tonerdephosphaten.

2. Durch langsames Eintrocknen von Teilen
der Insel, die unter Wasser stehen und die
Flocken dichter ausfallen lassen.

3. Durch Alterungsprozesse. Deshalb ist die
Quellungsfähigkeit und Plastizität bei älteren,
aus Phosphat-Tonschlamm hervorgegangenen
Phosphaten, die man im Pazifik als Alluvial-
Phosphat bezeichnet, sehr gering, fast gleich
Null, das sich dadurch erklären läßt, daß mit
zunehmendem Alter der rezenten, flockig
ausgefällten Phosphate (Guanolösungen auf