

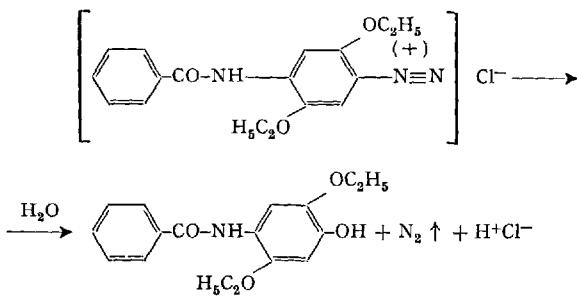
PRO EXPERIMENTIS

Zur Methodik der Artefaktausschaltung bei Anwendung von Diazoniumsalzen in der Histochemie (Phosphatasen, Esterasen usw.)

Die ausgedehnten Untersuchungen der letzten Jahre über die Verwendung von Diazoniumsalzen in der Histochemie^{1–8} haben diesen Verbindungen ein weites Anwendungsfeld eröffnet. Bereits um 1930 waren von CLARA zur Darstellung chromaffiner Zellen⁹ Diazoniumsalze herangezogen worden. Später führte GOMORI^{10,11} diese Verbindungen in die Histochemie ein.

Die Beständigkeit der verschiedenen Diazoniumsalze (z. B. Echtblausalz BB, Echtschwarz B, Echtblau R, Echtrot ITR usw.) ist in wässriger Lösung je nach pH sehr unterschiedlich, was besonders in der Histochemie zu verschiedenen Artefakten führen kann.

Jede histochemische Reaktion arbeitet nun mit einem grossen Überschuss an Substrat und einem Überschuss an Verbindungen, die durch Kupplungsreaktion, Reduktion oder Oxydation Farbstoff bilden. Eine dieser letzten Komponenten ist im vorliegenden Fall das Diazoniumsalz, welches auch zum Teil ohne Kupplung vom Gewebe adsorptiv gebunden wird. Dadurch kommt es aber häufig nach dem Eindecken des Präparates unter Bildung gasförmigen Stickstoffes zur Zersetzung dieses adsorbierten Diazoniumsalzes:



Der Lichteinfluss scheint dabei von einer gewissen Bedeutung zu sein; es zeigte sich nämlich, dass die Gasbildung in lichtschwachen Monaten viel geringer ist als in lichtstarken.

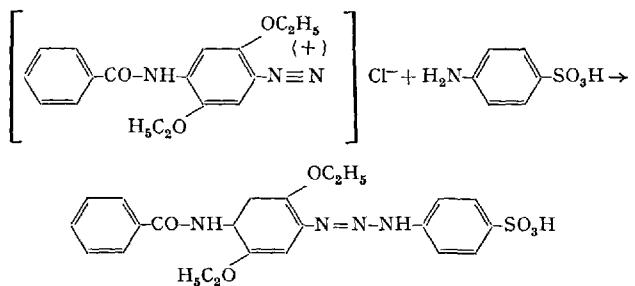
Diese N₂-Bildung kann besonders beim Arbeiten mit nativen Kryostatschnitten so ausgeprägt sein, dass eine Beurteilbarkeit des Schnittes unmöglich wird und der Schnitt innerhalb kürzester Zeit verdribt.

Diese Artefakte treten innerhalb der ersten Stunde nach dem Eindecken auf und kommen im allgemeinen nach max. 12–24 h zum Abschluss. Zur Vermeidung jener Störungen wurden von verschiedenen Seiten rasch härtende Eindeckungsmittel vorgeschlagen. BURSTONE¹² empfahl das Eindecken mit 20%igem Polyvinylacetat in 80%igem Alkohol, was sich bei uns wegen der partiellen Löslichkeit der Farbstoffe, in Übereinstimmung mit Gössner⁴, nicht bewährte.

Zur Ausschaltung der N₂-bedingten Artefakte gingen wir zunächst von der Vorstellung aus, dass das adsorptiv gebundene, von der jeweiligen Reaktion nicht erfassste Diazoniumsalz durch Kupplung mit Sulfanilsäure zu stabilisieren sei dürfte. Wir hofften damit, einen Zerfall der Diazogruppe zu verhindern und das störende Diazoniumsalz vielleicht auch besser auswaschen zu können. Dabei gingen wir so vor, dass wir nach der Inkubation mit Wasser spülten, in 1%iger Sulfanilsäure gelöst in 10%iger Essigsäure kurz nachinkubierten und dann nach nochmaliger intensiver Spülung mit Leitungswasser wie üblich

in Glycergelatine eindeckten. Es zeigte sich, dass die Nachinkubationszeit von der Art des gewählten Diazoniumsalzes, von der Inkubationsdauer sowie von der Schnittdicke abhängig ist. Es dürfte zweckmäßig sein, für die jeweiligen Bedingungen eine spezielle Nachinkubationszeit zu erproben (ca. 2–10 min).

Die Stabilisierung der Diazoniumsalze dürfte durch Bildung einer Diazoaminoverbindung zustande kommen:



Die Beobachtung, dass es auch bei Gegenfärbung mit Hämalaun nach MAYER zu keiner Bildung von Gasblasen nach den Eindecken der mit Diazoniumsalz behandelten Schnitte kam, liess uns in einer zweiten Versuchsreihe die Bildung von Metallsalzbindungen mit Diazoniumsalzen untersuchen: Zunächst prüften wir auf Grund unserer Erfahrungen mit Hämalaun die Wirkung von Kalialaun auf die N₂-Freisetzung. Es zeigte sich, dass auch mit [KAl(SO₄)₂ · 12 H₂O] die Gasbildung ohne Veränderung des histochemischen Reaktionsergebnisses zu unterbinden ist.

Der Mechanismus der Hemmung einer nachträglichen N₂-Freisetzung an Schnitten dürfte dem Aluminiumion des Kalialauns zukommen. Aluminium vermag bekanntlich – in gewisser Weise auch Cr⁺⁺⁺, Sn⁺⁺, Co⁺⁺ – mit verschiedenen organischen Verbindungen der Hydroxyanthrachinonreihe Farblacke und mit einigen Azofarbstoffen Komplexe oder Adsorptionsverbindungen zu bilden. Dadurch können letztere in ihren physikalischen Eigenschaften wie Löslichkeit und Adsorption entscheidend verändert werden. Aus der Präparationstechnik von Diazosalzen ist schliesslich bekannt, dass diese mit Metallsalzen Doppelsalze bilden. Die Metallsalze fungieren bei der trockenen Diazoniumverbindung als Stabilisator und verhindern damit einen explosionsartigen Zerfall der Diazogruppe.

In der Tat gelingt es mit einer 0,5 molaren salzauren Lösung von AlCl₃ bzw. ZnCl₂ durch kurzfristige Nachinkubation (2–3 min), die Zersetzung von adsorbiertem Diazoniumsalz zu unterbinden. Hierbei erwies sich AlCl₃ graduell

- ¹ M. M. NACHLAS und A. M. SELIGMAN, Anat. Rec. 105, 677 (1949).
- ² A. M. RUTENBURG und A. M. SELIGMAN, J. Histochem. Cytochem. 3, 455 (1955).
- ³ O. BRAUN-FALCO, Dermat. Wschr. 134, 1341 (1956).
- ⁴ W. GOSSNER, Histochemistry 1, 48 (1958).
- ⁵ O. BRAUN-FALCO und K. SALFELD, Nature 183, 51 (1959).
- ⁶ M. M. NACHLAS, T. P. GOLDSTERN, D. H. ROSENBLATT, M. KIRSCH und A. M. SELIGMAN, J. Histochem. Cytochem. 7, 50 (1959).
- ⁷ H. LÖFFLER, Histochemistry 2, 23 (1960).
- ⁸ M. BURSTONE und E. K. WEISSBURGER, J. Histochem. Cytochem. 9, 301, 349 (1961).
- ⁹ R. D. LILLIE, J. P. GRECO-HENSON und J. C. CASON, J. Histochem. Cytochem. 9, 11 (1961).
- ¹⁰ G. GOMORI, *Microscopic Histochemistry* (University Press, Chicago 1952).
- ¹¹ G. GOMORI, J. lab. clin. Med. 37, 526 (1951).
- ¹² M. S. BURSTONE, J. Histochem. Cytochem. 5, 196 (1957).

als das wirksamere Nachinkubationsmittel. Die Stabilisierung der $\left[\begin{smallmatrix} (+) \\ -N \equiv N \end{smallmatrix} \right]$ -Gruppe beruht auf einer Salzbildung:
 $R\left[\begin{smallmatrix} (+) \\ -N \equiv N \end{smallmatrix} \right]^+ \cdot AlCl_3^-$ bzw. $R\left[\begin{smallmatrix} (+) \\ -N \equiv N \end{smallmatrix} \right]^+ \cdot \frac{1}{2} ZnCl_4^-$.

Die Anwendung der von uns vorgeschlagenen Methodik hat sich auch am hämatologischen Ausstrich und am Tupfpräparat, wo nach der Eindeckung mit Glycerin-gelatine die Blasenbildung (N_2) die Beurteilung des gesamten Ausstrichs unmöglich machen kann, ausgezeichnet bewährt.

Fasst man zusammen, so ergibt sich folgendes Bild: Die Nachinkubation von histochemisch entwickelten Diazoniumsalz-Farbreaktionen mit 1%iger essigsaurer Sulfanilsäurelösung, 5–10%igem Kalialaun, 0,5 molarer salzsaurer $AlCl_3$ - oder $ZnCl_2$ -Lösung vermag in einem histologischen oder hämatologischen Ausstrich den Artefakt einer N_2 -Bildung durch Zersetzung von Diazoniumsalz nach dem Eindecken zu verhindern. Die Zeitspanne der Nachinku-

bation sollte je nach Material und Diazoniumsalz empirisch ermittelt werden.

Summary. A post-incubation with 1% sulfanilic acid solution in 10% CH_3COOH (approx. 2–10 min) or 5–10% potash alum or 0.5 mol $AlCl_3$ in 0.1 n HCl—after the histochemical reaction with diazonium salt—prevents N_2 formation. This gas originates from decomposition of tissue adsorbed diazonium salt which occurs after mounting in glycerin jelly. The inhibition of diazo-group disintegration depends, in the case of sulfanilic acid, on the formation of a diazoamino compound or double salt production with aluminium ions in the case of $AlCl_3$.

W. MEIER-RUGE und ELISABETH MEIER

Abteilung für experimentelle Pathologie und Histochemie der Sandoz AG, Basel (Schweiz), 1. März 1963.

Examination of Cannabis Resin by Means of Ferric Chloride Test

Several methods for the characterization of cannabis resin worked out in this Institute have been described in previous papers^{1–6}. The present communication deals with the possibilities for characterising the resin by means of a reaction with $FeCl_3$.

The technique applied was based on a modified $FeCl_3$ reaction on cannabis originally described by FULTON⁶. To 10 ml of a 0.05% solution of the resin (i.e. of a dry petrol ether extract of cannabis) in absolute methanol, 0.1 ml of a freshly prepared 1% $FeCl_3$ solution in absolute methanol is added and the colour developed (A) is recorded. Thereafter, the liquid is divided into two equal parts. To the first part, 1 ml of water is added and the colour (B) observed. To the second part, 1 ml of a 1% ammonium acetate solution in absolute methanol is added at once, quickly mixed up and the colour (C) observed immediately. Corresponding numerical values for the three colours developed are recorded according to the scheme attached. The total sum of the three values is called 'FeCl₃ value'.

Altogether 96 samples of cannabis originating from 17 countries have been examined by means of the above test. $FeCl_3$ values in various samples have ranged from 0 to 9. The lowest values (0 to 2) have been found in samples from tropical countries which have been classified in previous work^{1–5} as belonging to the 'ripe' and 'overripe' type. In addition, decomposed, altered and old samples from other regions also exhibited a low $FeCl_3$ value. The

highest values (6 to 9) were found in samples which have been classified as 'unripe' by means of other methods^{1–5}. Values from 3 to 6 were mostly obtained for the 'intermediate' type of the resin. Detailed results will be tabulated in a document of the United Nations ST/SOA/SER.S series.

Among the constants of cannabis resin which have been studied earlier^{3–5}, both the ratio E_{300}/E_{310} , as obtained by the method of direct ultraviolet spectrophotometry⁴, and the antibiotic potency expressed in penicillin units equivalent to 60 mg of resin⁵, have been found to be closely correlated with $FeCl_3$ value. As previously explained^{4,5}, both constants are connected with the content of cannabidiolic acid in the resin examined.

From various cannabinolic compounds, only cannabidiolic acid exhibited a positive $FeCl_3$ test. This constituent may be considered as being predominant in fresh cannabis and in samples exhibiting a high $FeCl_3$ value. The constant is obviously decreased by the progress of gradual conversion of cannabinoids.

Consequently, in addition to previous methods for characterizing cannabis resin, $FeCl_3$ test may be used as a rough indication of cannabidiolic acid content as well as

¹ L.J. GRLIĆ and A. ANDREC, Exper. 17, 325 (1961).

² L.J. GRLIĆ, J. Pharm. Pharmacol. 13, 637 (1961).

³ L.J. GRLIĆ, Acta Pharm. Jugosl. 11, 123 (1961).

⁴ L.J. GRLIĆ, Farm. Glas. 17, 424 (1961).

⁵ A. RADOŠEVIĆ, M. KUPINIĆ, and L.J. GRLIĆ; Nature 195, 1007 (1962).

⁶ C. C. FULTON, Ind. Eng. Chem. 14, 407 (1942).

Scheme for numerical classification of colours obtained with $FeCl_3$ test

| Colour A | Colour B | Colour C | Value |
|-------------------------------|--------------------------------|-----------------------------|-------|
| Violet or blue | Clearly violet, indigo or blue | Purplish red | 3 |
| Clearly green or bluish green | Weakly blue or weakly indigo | Transient red | 2 |
| Greyish green | Greyish indigo | Transient brownish red | 1 |
| Yellowish green | Yellow or brown to green | Immediately brown or yellow | 0 |