

## Qualitative Mikroanalyse und chemische Mikroskopie\*

Von HANS WALDMANN

Chemische Forschungsabteilung der F. Hoffmann-La Roche & Co. AG, Basel

### Zusammenfassung und Ausblick

Es wird eine Übersicht über die Arbeitsweise der mikrochemischen qualitativen Analyse gegeben. Die Überlegungen, die zur Entwicklung hochempfindlicher, selektiver und spezifischer Nachweisreaktionen dienen, werden besprochen und an Beispielen von anorganischen und organischen Anwendungen erläutert. Die Probleme der mikroskopischen Mikrochemie werden an Untersuchungen aus der Histochemie dargestellt.

Für die meisten anorganischen Ionen gibt es heute zuverlässige mikrochemische Nachweisverfahren, sowohl für die Bearbeitung kleinster Substanzmengen als auch zur Prüfung auf Spurenelemente. Für die Probleme der organischen Chemie stehen ebenfalls eine Reihe interessanter Verfahren zur Verfügung und weitere vielversprechende Ansätze sind vorhanden.

Die Möglichkeiten einer Weiterentwicklung der qualitativen Mikroanalyse zeichnen sich nach drei Richtungen hin ab:

Verfeinerung der Arbeitstechnik,  
Ausarbeitung neuer Nachweisreaktionen und  
Anwendung der Tüpfeltechnik auf spezielle Fragestellungen  
der täglichen Laboratoriums- und Betriebspraxis.

\* Vortrag anlässlich der Winterversammlung des Schweizerischen Chemiker-Verbandes am 31. Januar 1959 in Freiburg.

Die heutige qualitative Mikroanalyse fußt im wesentlichen auf den grundlegenden Arbeiten von FRITZ FEIGL, die er 1917 begonnen und seither in rastloser Forschung systematisch und erfolgreich ausgebaut hat<sup>3, 4, 5, 14</sup>. FEIGL bezeichnet die qualitative Mikroanalyse als die *Chemie der spezifischen, auswählenden und hochempfindlichen Reaktionen*<sup>3</sup> oder kurz «Tüpfelreaktionen»<sup>\*\*</sup>.

Die Aufgaben der qualitativen Mikroanalyse gehen im wesentlichen in zwei Richtungen, nämlich

1. die Anwendung analytisch verwertbarer Reaktionen auf minimale Substanzmengen und
2. die Erfassung von geringsten, meist unerwünschten Beimengungen neben großem Überschuss anderer, häufig nahe verwandter Ionen oder Verbindungen.

\*\* Diese historisch begründete Kurzbezeichnung, die vom Auf-tüpfeln der Untersuchungs- und Reagenslösungen auf Filterpapier herrührt, wurde auch in andere Sprachen übernommen; französisch: Réaction à la goutte, ou à la touche, ou stilliréaction; englisch: Spot Test or Drop Test.

Der Bereich dieser Spurenanalyse betrifft die Größenordnung um 0,001 % (= 10<sup>-5</sup>) und weniger.

In beiden Arbeitsrichtungen ist mit den klassischen analytischen Trennungsmethoden und Unterscheidungsmerkmalen im allgemeinen nicht mehr viel auszurichten. Das anzustrebende Ziel ist die Identifizierung (und auch Bestimmung) minimalster Substanzmengen mit größtmöglicher Zuverlässigkeit bei geringem Arbeitsaufwand. Dazu braucht es nicht nur besonders hochempfindliche Reagenzien; um spezifische Nachweisverfahren zu erhalten, muß die ganze Ausführung in Kenntnis aller Einzelheiten des Reaktionsablaufes bis aufs letzte ausgefeilt und dem geforderten Zweck angepaßt sein.

Betrachten wir zuerst, wie man die Leistungsfähigkeit einer Nachweisreaktion zahlenmäßig angibt. Man verwendet dazu die beiden Begriffe:

<i>Erfassungsgrenze</i> , in $\gamma$ bzw. $\mu\text{g} = 10^{-6}\text{g}$ angegebene, eben noch erfaßbare Substanzmenge . . . . .	Zum Beispiel 0,25 $\gamma$
<i>Grenzkonzentration</i> (Verdünnungsgrenze), obige $\gamma$ -Menge in z. B. 1 Tropfen = 0,05 ml gelöst . . . . .	1 : 200 000
ausgedrückt in Zehnerpotenzen . . . . .	= 1 : 2 $\times 10^5$
oder als negativer Exponent . . . . .	= 10 <sup>-5,30</sup>

Mit einer bestimmten Reaktion lassen sich also bei einer Verdünnung von 1:200 000 in 1 Tropfen (= 0,05 ml) noch 0,25  $\gamma$  eines bestimmten Ions nachweisen. In diesen Zahlen sind alle Faktoren, die sich bei der Durchführung der Reaktion ergeben, wie der Einfluß von störenden Ionen, Maskierungsagenzien usw., mit eingeschlossen.

Diese Angaben ändern sich, je nach der Art der Ausführung der Reaktion, ob im Tropfen auf der Tüpfelplatte (also in flüssiger Phase), oder auf Tüpfelpapier. Bei der wörtlich genommenen Tüpfelanalyse, nämlich bei der Durchführung der Reaktionen auf Filterpapier, spielen die besonderen Eigenschaften des Tüpfelpapiers eine ausschlaggebende Rolle: in dem Kapillarsystem des Trägers erfolgen Trennungen durch verschiedene starke Adsorption und Diffusion (siehe Papierchromatographie); es treten Reaktionsbeschleunigungen katalytischer Art auf, Fixierung von Niederschlägen und anderes mehr.

Tüpfelpapier ist wohl unser häufigstes *Hilfsmittel*. Daneben ist der Bedarf an Apparaten eher bescheiden; zu nennen sind: Tropfflaschen und Tropfpipetten, Tüpfelplatten (weiß und schwarz). Die meisten Spezialapparate betreffen Vorrichtungen zum Auffangen gasförmiger Reaktions- oder Zersetzungsprodukte, sei es in Reagenslösungen oder auf reagensgetränkten Tüpfelpapieren. Andere Hilfsmittel sind sinngemäße Verkleinerungen bekannter Geräte (Wasser- und Luftbäder, Trockenblock).

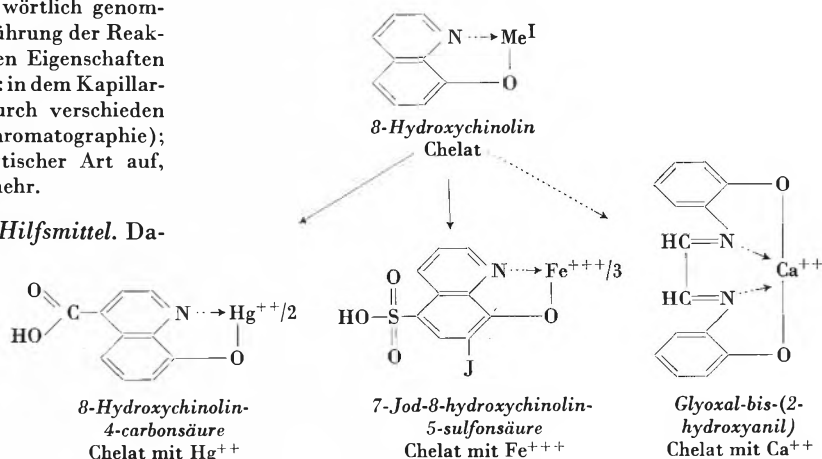
Trennungen, wie sie im klassischen Analysengang in jeder Stufe vorkommen, werden in der Mikroanalyse nach Möglichkeit vermieden. Wo solche nicht zu umgehen sind, tritt an die Stelle von Trichter und Filter das Spitzröhrchen und die Zentrifuge. Elegantere Methoden der Abtrennung und Anreicherung sind Ausschüttele-

ungsverfahren, z. B. mittels *Diphenylthiocarbazon* (= *Dithizon*) in Tetrachlorkohlenstoff oder mittels *Acetylaceton* für verschiedene Gruppen von Metallen, ferner Adsorptionsverfahren (Säulenchromatographie). Auch das Zonenschmelzverfahren (SCHILDKNECHT<sup>11</sup>) scheint zur Abtrennung und Anreicherung vielversprechend.

**Mikroverfahren in der anorganischen Analyse**

Einen entscheidenden Erfolg in mikroanalytischer Richtung brachte erst die *Einführung organischer Reagenzien in die anorganische Analyse*; das erste dieser Gruppe ist das wohlbekannte Dimethylglyoxim zur Abscheidung von Nickel. Heute gibt es solche organische Reagenzien in großer Zahl (WELCHER<sup>13</sup>). Man kennt eine Reihe von Verbindungsklassen, die mit geringsten Mengen zahlreicher Metalle gefärbte schwerlösliche innere Komplexsalze oder Chelate bilden. Aber diesen Grundtypen kommt nur eine Selektivität für bestimmte Kationengruppen zu, so z. B. dem *8-Hydroxychinolin* (= *Oxin*). Erst durch systematische chemische Abwandlung gelang es, die Selektivität zu verbessern, und daraus eine spezifische Nachweisreaktion für ein bestimmtes Kation auszuarbeiten:

So für das Quecksilber(II)-ion die *8-Hydroxychinolin-4-carbonsäure* oder für dreiwertiges Eisen die *7-Jod-8-hydroxychinolin-5-sulfonsäure*. Eine ganz ähnliche Struktur der aktiven Gruppierung weist das kürzlich als spezifisches Calciumreagens beschriebene *Glyoxal-bis-(2-hydroxyanil)* auf<sup>7</sup>. Die Erfassungsgrenze für Calcium beträgt 0,05  $\gamma$  (in reinen Lösungen) bis etwa 30  $\gamma$  bei Anwesenheit großer Mengen störender Kationen (Mg, Ba, Sr, Pb).

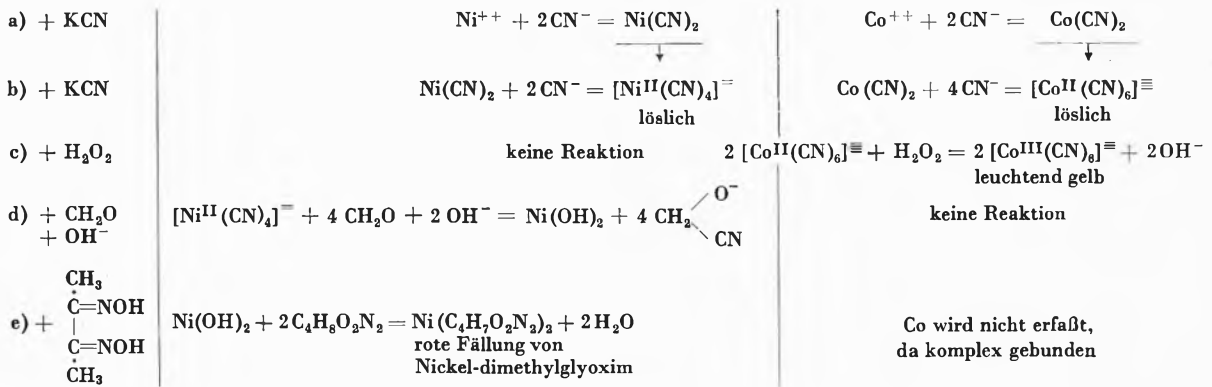


Ein selektives Reagens kann seine Aufgabe nur dann einwandfrei erfüllen, wenn alle Begleitumstände der Reaktion berücksichtigt werden. Dazu gehört in erster Linie die Einstellung des geeigneten pH-Wertes.

Ein Nachweis kann auch dadurch spezifisch gemacht werden, daß man störende Ionen – anstatt sie abzutrennen – durch chemische Veränderung ausschaltet; man nennt diesen meist sehr wirksamen Kunstgriff *Maskierung*. Sie wird bewerkstelligt durch Überführung in

andere Wertigkeitsstufen, oder – sehr häufig – durch Überführung in komplexe Bindung. Die wichtigsten, zur Maskierung verwendeten Komplexbildner sind

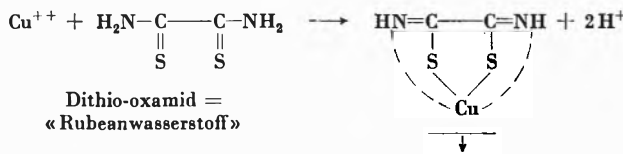
- Cyanwasserstoffsäure (komplexe Eisencyanide!)
- Fluorwasserstoffsäure
- Ortho- und Pyro-phosphorsäure
- Weinsäure
- Oxalsäure
- Äthylendiamintetraessigsäure, ÄDTE (EDTA)  
(Ist gerade zum Maskieren erfunden worden!)



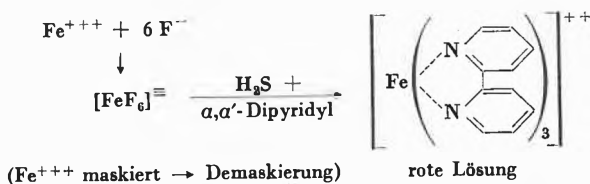
Man darf aber nicht vergessen, daß bestimmte Nachweisverfahren auch versagen können, weil das zu erfassende Ion durch die Anwesenheit einer dieser Verbindungen maskiert sein kann; man muß dann Mittel und Wege zur *Demaskierung* suchen.

An einigen weiteren Beispielen sollen die wichtigsten Reaktionstypen sowie das Zusammenspiel der hauptsächlichsten chemischen Faktoren erläutert werden:

Auf der Bildung eines inneren Komplexsalzes (gleich wie beim 8-Hydroxychinolin) beruht der Nachweis von Cu<sup>++</sup> mittels *Dithio-oxamid* (= *Rubeanwasserstoff*). Bei der Ausführung als Tüpfelreaktion auf Filterpapier beträgt die Erfassungsgrenze 0,2 γ Cu. Die Nachweisempfindlichkeit kann noch um einen Faktor etwa 1000 verbessert werden, wenn man anstatt auf Papier die Reaktion auf Gelatine oder auf menschlicher Haut ausführt. Dies als Beispiel für die Abhängigkeit der Empfindlichkeit einer Tüpfelreaktion vom Substrat, auf welchem man sie durchführt.



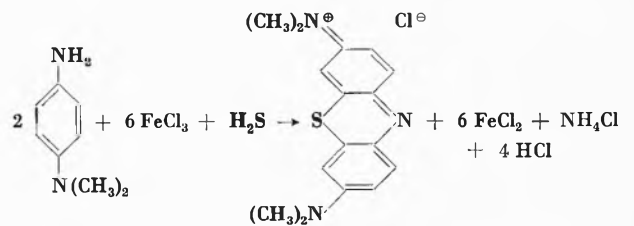
Das Eisen(III)-ion wird in Gegenwart von Fluorid als (FeF<sub>6</sub>)<sup>-</sup>-Anion komplex gebunden – maskiert –, es spricht nicht mehr auf die üblichen Nachweisverfahren (Berlinerblau- oder Rhodanidreaktion) an. Zur Demaskierung reduziert man das Fe<sup>+++</sup> durch H<sub>2</sub>S zur Ferrostufe und weist diese mittels



*α,α'-Dipyridyl* nach (Beispiel eines sogenannten Durchdringungskomplexes im Gegensatz zum Chelat).

Eine kompliziertere Reaktionsfolge zeigt der Nachweis von *Nickelspuren in Kobaltsalzen*. Das Beispiel enthält Maskierung durch Komplexbildung, Oxydation des Kobalts im Komplex, anschließend selektive Demaskierung und Nachweis des Nickels. Die praktische Ausführung ist trotz der verwickelten Chemie immer noch von eleganter Einfachheit: In der Vertiefung einer Tüpfelplatte läßt man nacheinander die 5 Reagenslösungen Kaliumcyanid, Wasserstoffsuperoxyd, Formaldehyd, Kalilauge und Dimethylglyoxim auf das zu prüfende Salz einwirken; ein roter Niederschlag zeigt Nickel an.

Im Gegensatz zu den besprochenen Verfahren kann man auch rein organische Synthesen der Analytik anorganischer Gruppen dienstbar machen. So ist z. B. die Entstehung von Metylenblau aus *p*-Aminodimethylanilin + Eisen(III)-chlorid nur möglich, wenn *Schwefelwasserstoff* als weiterer Baustein anwesend ist. Damit wird diese ganz anders geartete, aber leicht durchführbare Reaktion zu einem spezifischen Nachweis für H<sub>2</sub>S.



Der Vollständigkeit halber seien noch die weiteren Möglichkeiten erwähnt, welche sich durch Oxydations-Reduktions-Reaktionen sowie durch katalytische Wirkungen und induzierte Reaktion bzw. Fällungen für analytische Zwecke bieten.

Für die wichtigsten anorganischen Ionen gibt es zuverlässige mikrochemische Nachweisverfahren, sowohl für die Bearbeitung kleinster Substanzmengen als auch zur Spurenanalyse<sup>12</sup>.

### Tüpfelanalyse in der organischen Chemie

Im Sektor der organischen Chemie ist die qualitative Analyse allgemein viel komplexer als im anorganischen. Es sind ja im Grunde genommen nur wenige Elemente am Aufbau einer ungeheuren Anzahl verschiedenartiger Verbindungen beteiligt. Der Nachweis der Grund-

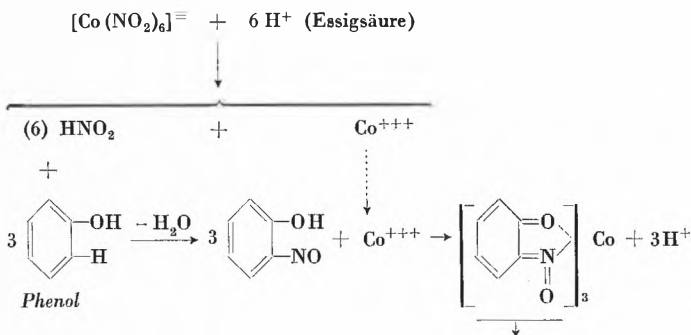
elemente allein sagt über die einzelne Verbindung meistens nicht viel aus; im Vordergrund des Interesses stehen dagegen die funktionellen Gruppen und ihre gegenseitigen Zusammenhänge, die den Gesamtcharakter der Verbindung bestimmen.

Je nach der Problemstellung ergeben sich im wesentlichen drei Bearbeitungsstufen:

1. Orientierung durch Vorprobereaktionen über den Charakter des Untersuchungsmaterials (spezielle Elemente, wie N, Halogene, S, P, besondere Kationen oder Anionen, saures bzw. basisches Verhalten, Verbrennungprobe usw.),
2. Aufspürung und Identifizierung bestimmter funktioneller Gruppen,
3. Identifizierung individueller organischer Verbindungen.

Auf die Vorprobereaktionen – so interessant sie sind – kann nicht näher eingegangen werden. Wir wenden uns den Tüpfelreaktionen zum *Nachweis funktioneller Gruppen* zu. Für diese kann man sich in vielen Fällen die Gegenseitigkeit der Umsetzungen zunutze machen und damit auf gewisse Nachweismethoden der anorganischen Analyse zurückgreifen, z. B. auf die Bildung von inneren Komplexsalzen:

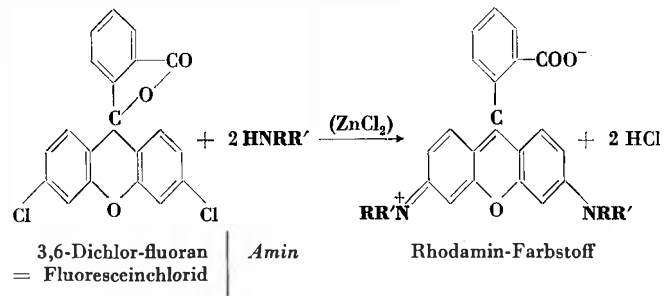
$\alpha,\beta$ - sowie  $\beta,\alpha$ -Nitrosonaphtol sind empfindliche Reagenzien auf Kobalt; umgekehrt kann man also mittels Co diese  $o$ -Nitrosonaphtole oder allgemein  $o$ -Nitrosophenole nachweisen. Diese Reaktion wurde in bemerkenswert einfacher Weise weiter ausgebaut zu einem allgemeinen *Nachweis von Phenolen* mit freier, d. h. nitrosierbarer *ortho*-Stellung: Man erhitzt das Phenol mit Na-Hexanitrokobaltat in essigsaurer Lösung, das Reagens zerfällt in  $Co^{+++}$  und salpetrige Säure, welche nitrosiert (Formelschema nicht stöchiometrisch; Erfassungsgrenze 0,5 bis 5  $\gamma$  für verschiedene Phenole).



Ein anderes Beispiel dieser Art ist die Überführung von Carbonsäuren, deren Ester und Anhydride in Hydroxamsäuren  $R-CO(NHOH)$ , die mit Eisen(III)-Salzen tief rot-violette innere Komplexsalze liefern.

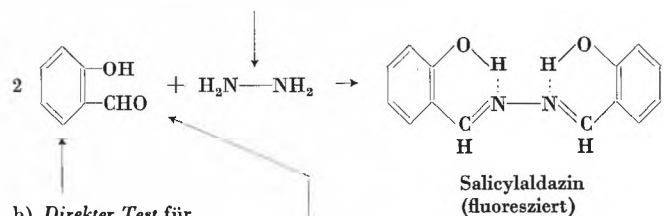
Es können auch typisch organische Umsetzungen, Kondensationsreaktionen sowie kompliziertere Synthesen als Tüpfelreaktionen auf organische Verbindungen eingesetzt werden.

Am Beispiel der *primären und sekundären Amine* und deren Nachweis durch Überführung in rote und zum Teil fluoreszierende Rhodaminfarbstoffe sei eine solche einfache Kondensationsreaktion erläutert. Man schmilzt das Amin in Gegenwart von Zinkchlorid mit dem 3,6-Dichlorfluoran zusammen und erhält rote Farbstoffe; Erfassungsgrenze 5 bis 30  $\gamma$  Amin.

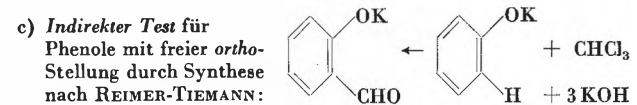


Ausgehend von einer anderen Kondensationsreaktion wollen wir die Möglichkeit von Synthesen zum Nachweis bestimmter funktioneller Gruppen besprechen: Im Mittelpunkt steht die *Kondensation von Salicylaldehyd mit Hydrazin zu Salicylaldazin*, das durch seine intensive gelb-orange Fluoreszenz erkannt wird (die Aldazine aus den entsprechenden *m*- und *p*-Hydroxyverbindungen zeigen keine Fluoreszenz). Auch diese Reaktion läßt sich auf beide Komponenten hin auswerten: einerseits zum Nachweis von Hydrazin (das z. B. aus Hydraziden abgespalten wird) mittels Salicylaldehyd. Umgekehrt kann man Salicylaldehyd und allgemein *o*-Hydroxyaldehyde und *o*-Hydroxyketone durch Kondensation mit Hydrazin nachweisen.

a) *Nachweis von Hydrazin*,  
z. B. aus Hydraziden:



b) *Direkter Test für Salicylaldehyd*, ferner aromatische *o*-Hydroxyaldehyde und *o*-Hydroxyketone



Die zugrunde liegende Reaktion kann in einem noch weiteren Rahmen nutzbar gemacht werden, nämlich allgemein zum Nachweis von Phenolen mit freier *ortho*-Stellung. Durch die altbekannte Synthese nach REIMER-TIEMANN (Einwirkung von Chloroform und KOH auf Phenole) erhält man *o*-Hydroxyaldehyde, die man als «Aldazine» nachweist.

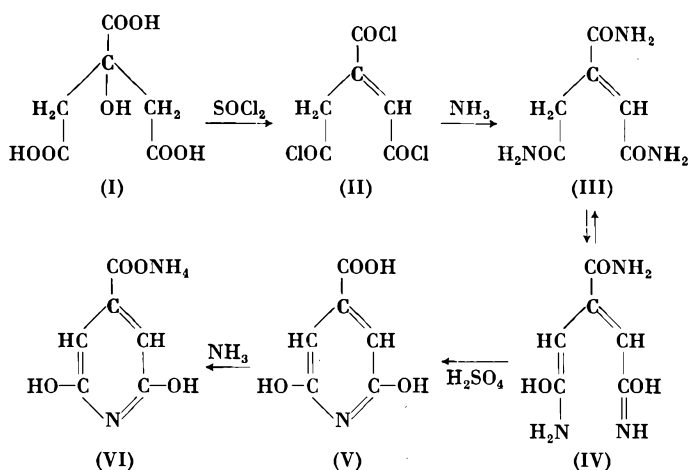
Erfassungsgrenzen für:

freies Hydrazin . . . . .	0,1 $\gamma$
Hydrazide . . . . .	0,2 bis 2,5 $\gamma$
<i>o</i> -Hydroxy-aldehyde und -ketone	0,1 bis 7 $\gamma$
Phenole . . . . .	2,5 bis 50 $\gamma$ (gewisse höher substituierte Phenole und Naphtole reagieren nicht)

Für die *Identifizierung einzelner organischer Verbindungen* müssen besonders hohe Anforderungen an die Spezifität der Reaktion gestellt werden. Solche spezi-

fische Nachweise lassen sich wohl nur für relativ einfache Verbindungen finden.

Als besonders instruktives Beispiel sei hier die Probe auf Citronensäure (I) durch Überführung in Citrazinsäure (V), deren Ammoniumsalz (VI) sich durch intensive Fluoreszenz zu erkennen gibt, genannt.



Wie diese Beispiele zeigen, kann und soll das Arbeitsprinzip für die Anwendung der Tüpfelanalyse auf organische Verbindungen ebenso elegant und einfach bleiben wie im anorganischen Sektor. Meistens handelt es sich auch hier um «Eintopf-Reaktionen». Dabei ist es nicht notwendig, daß eine Kondensation oder größere Synthese mit maximaler Ausbeute oder gar quantitativ verläuft; auch zur Erfassung kleiner Substanzmengen genügt es, wenn die Nachweisreaktion selbst von ausreichender Empfindlichkeit ist. Die bis jetzt beschriebenen Reaktionen gestatten, sogar in ungünstigen Fällen noch Bruchteile eines Milligramms sicher nachzuweisen, vorausgesetzt, daß ein Nachweis überhaupt möglich ist.

Es liegt in der Vielfalt der organischen Verbindungen und ihrer Reaktionsmöglichkeiten begründet, daß sich bezüglich Selektivität und Empfindlichkeit viel größere Störungsmöglichkeiten ergeben als in der anorganischen Chemie. Andererseits liegt hier für die analytische Forschung ein praktisch unerschöpfliches und recht vielversprechendes Feld vor uns; das Werk von FEIGL<sup>5</sup> gibt eine Übersicht über das Vorhandene und über die Art und Weise, wie neue Probleme anzupacken sind, ferner gibt es Anregungen für die Lösung praktisch wichtiger Fragestellungen.

### Chemische Mikroskopie

Die mikroskopische Mikrochemie ist ein analytisches Arbeitsgebiet, das heute nur in ganz speziellen Richtungen eine breitere Anwendung gefunden hat. Das sind vor allem die von L. (†) und A. KOFLER in Innsbruck systematisch bearbeiteten Thermo-Mikromethoden zur Kennzeichnung organischer Stoffe und Stoffgemische<sup>8, 6a</sup>. Die Möglichkeiten gehen weit über die Schmelzpunktbestimmung unter dem Mikroskop hinaus; es lassen sich damit Modifikationen, Phasenumwandlungen,

Mehrstoffsysteme, auch die Entstehung von Molekülverbindungen sowie die kristalloptischen Verhältnisse studieren, ferner eutektische Punkte und Lichtbrechungen von Schmelzen bestimmen. In den USA hat diese Arbeitsrichtung eine etwas abweichende Entwicklung genommen (McCRONE<sup>9, 14a</sup>).

Das Gebiet der mikroskopischen Chemie ist jedoch viel weitschichtiger: Man bedient sich des Mikroskopes zum Schauen. Damit will man in erster Linie die Untersuchungsobjekte rein morphologisch erfassen, sie nach ihrem Aussehen (Form, Farbe usw.) einteilen, vergleichen und zu erkennen suchen. Diese direkte morphologische Betrachtung, die in vielen Gebieten der biologischen Wissenschaften eine bedeutende Rolle spielt, wird heutzutage vom Chemiker viel zu wenig ausgeübt; wahrscheinlich, weil er mit dem Mikroskop nicht genügend vertraut ist.

BENEDETTI-PICHLER<sup>1, 2</sup> ist einen Schritt weiter gegangen. Für die Untersuchung von  $\mu\text{g}$ - ( $\gamma$ -) Mengen arbeitet er chemisch unter ständiger mikroskopischer Beobachtung. Er braucht außer dem Mikroskop den Mikromanipulator, um Lösungen (z. B. Reagenzien) abzumessen und in die Reaktionsgefäße überzuführen. In den winzigen Mikro-Kelchen kann er den ganzen anorganischen Analysengang durchführen, einschließlich  $\text{H}_2\text{S}$ -Trennung, Erhitzen, Zentrifugieren usw.

Ein als «Chemiker-Mikroskop» (Abb. 1) bezeichnetes Instrument\* ist speziell für die Bedürfnisse des Chemikers entwickelt worden (<sup>6b</sup> S. 445). Die unter dem Tisch angeordneten Objektive von schwacher bis mittlerer Vergrößerung erlauben die Untersuchung von Niederschlägen in allen dem Chemiker gewohnten Gefäßen. Der Raum über dem Objektisch ist frei zur Vornahme von Manipulationen: Auf Glasplatten oder in Uhrgläsern lassen sich unter mikroskopischer Beobachtung verschiedene Reaktionen ausführen. Die Handhabung wird außerdem sehr erleichtert, da es gelungen ist – zum Unterschied vom gewöhnlichen Mikroskop –, ein aufrechtes und seitenrichtiges Bild zu erzeugen. Vorrichtungen für polarisiertes Licht sind wertvoll für die Untersuchung von kristallinen Niederschlägen.

Eigene Untersuchungen, die in letzter Zeit unter Einsatz des Chemiker-Mikroskops durchgeführt wurden, betreffen ein Grenzgebiet zwischen chemischer Analyse und pathologischer Anatomie, nämlich die *Histochemie*<sup>10</sup>, speziell von kristallinen Ablagerungen in Geweben des menschlichen und tierischen Organismus. Im Vordergrund stehen die häufigen und verschiedenartigen Konkrementbildungen in der Niere und den ableitenden Harnwegen. Da findet man Calciumoxalate (es gibt zwei verschieden kristallisierende Ca-Oxalate von unterschiedlichem Kristallwassergehalt), mehrere Erdalkaliphosphate (Tricalciumphosphat, Carbonat- und Hydroxylapatit,  $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MgNH}_4\text{PO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ), ferner Cystin, Harnsäure und Urate, um nur die wichtigsten

\* Hersteller: E. Leitz, Optische Werke, Wetzlar.



Abb. 1. Chemiker-Mikroskop nach WALDMANN, monokular, mit Beleuchtung und Polarisationsfilter (E. Leitz, Wetzlar)

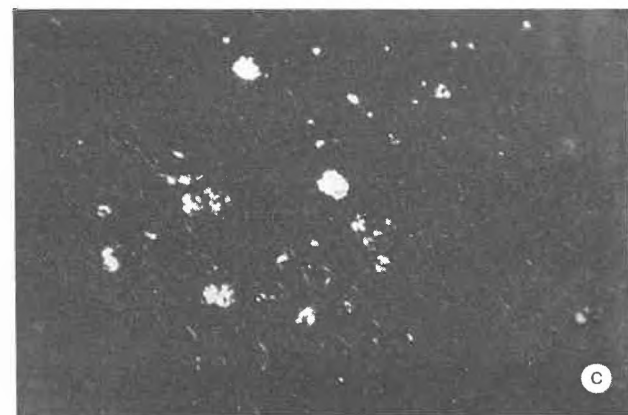
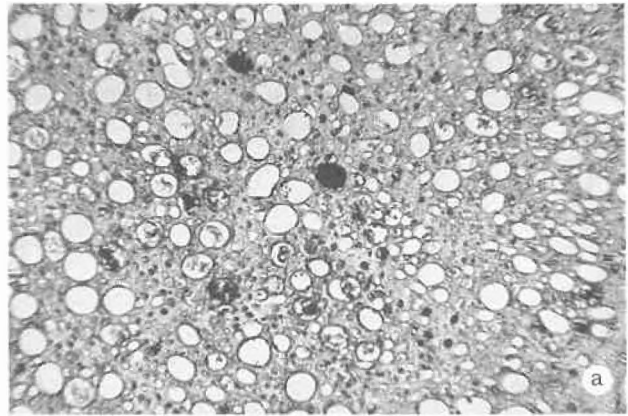


Abb. 3a bis c. Calciumoxalat-Monohydrat als Ablagerung in Nierengewebe (Vergrößerung 38:1)

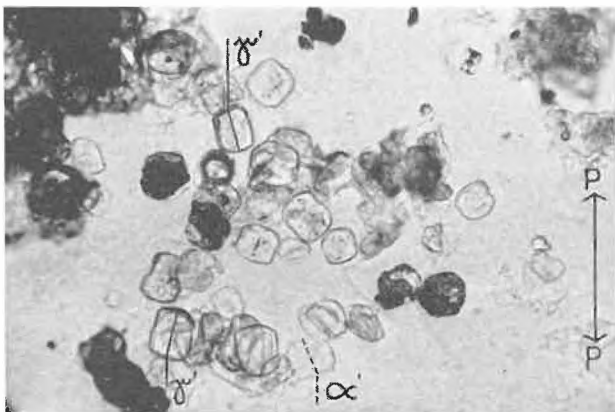


Abb. 2. Calciumoxalat-Monohydrat in wohl ausgebildeten Kristallen in Nierengewebe (Vergrößerung 275:1): Mikrochemisch Calcium und Oxalsäure nachweisbar, sowie etwas Phosphorsäure. Identifizierung des Calciumoxalats als Monohydrat\* auf kristalloptischem Wege. Polarisator  $P \leftrightarrow P$  allein; man beachte die großen Lichtbrechungsunterschiede (= hohe Doppelbrechung) in Abhängigkeit von der Orientierung: bei  $\alpha'$  niedrige, bei  $\gamma'$  hohe Lichtbrechung (Relief).

\* Als Harnsediment bekannt sind die oktaederähnlichen (als «Briefkuvertformen» bezeichneten) Kristalle des Calciumoxalat-Polyhydrats  $(CaC_2O_4)_2 \cdot 5H_2O$ .

- a) Kristalline Ausfüllungen in mehreren der im Schnitt ungefähr senkrecht getroffenen Nierenkanäle. Beim Erhitzen unverändert bis über  $200^\circ$
- b) Die gleiche Präparatenstelle nach Veraschung bei 500 bis  $525^\circ$ . Die Kristallniederschläge sind erhalten geblieben, sie geben sich dadurch als reich an anorganischem Material zu erkennen. Genaue Übereinstimmung der Verteilung mit dem vorangehenden Bild
- c) Das veraschte Präparat im polarisierten Licht (gekreuzte Nicols, Schwingungsrichtungen parallel den Bildkanten): Die Kristalle zeigen starke Doppelbrechung (Aufleuchten!), ähnlich wie beim unveraschten Schnitt. Bei der gewählten Temperatur geht Calciumoxalat unter  $CO$ -Abspaltung in Calciumcarbonat (Calcit, mit ähnlichen Doppelbrechungsverhältnissen wie das Oxalat) über; beim Antüpfeln mit Salzsäure lebhaftes  $CO_2$ -Entwicklung

zu nennen. In anderen Organen treten Cholesterinablagerungen im Bindegewebe auf, für sich allein und neben anderen Konkrementen (z. B. Calciumphosphat).

Untersuchungen dieser Art zur Identifizierung obiger Verbindungen einzeln und nebeneinander – an Schnitten von etwa  $1/100$  mm Dicke vorzunehmen – lassen sich nicht mehr auf rein chemischer Basis durchführen; man muß sich zuerst durch kristalloptische Messungen, Löslichkeitsuntersuchungen, Schmelz- und Veraschungsproben orientieren, mit welcher Körperklasse man es zu tun hat. Die Krönung bildet dann die mikrochemische Reaktion, die in vielen Fällen eine spezielle Arbeitstechnik erfordert.

So ist es auch gelungen, die bekannte Murexidprobe auf Harnsäure als histochemische Nachweisreaktion auszubauen; sie ist durch gute Nachweisempfindlichkeit (0,01 bis 0,05  $\gamma$  Harnsäure oder Urate) und ausreichende Lokalisationstreue ausgezeichnet.

#### Literatur

<sup>1</sup> A. A. BENEDETTI-PICHLER, *Introduction to the Microtechnique of Inorganic Analysis*, John Wiley, New York 1942.

<sup>2</sup> A. A. BENEDETTI-PICHLER, Chemical Experimentation under the Microscope, *Microchem. J.* 2 (1958) 3.

<sup>3</sup> F. FEIGL, *Chemistry of Specific, Selective and Sensitive Reactions*, Academic Press, New York 1949 (theoretische Behandlung der Grundlagen).

<sup>4</sup> F. FEIGL, *Spot Tests*, Vol. I; *Inorganic Applications*, 4<sup>th</sup> Edition, Elsevier, Amsterdam/London/New York 1954.

<sup>5</sup> F. FEIGL, *Spot Tests in Organic Analysis* (formerly Vol. II), 5<sup>th</sup> Edition, Elsevier, Amsterdam/London/New York 1956.

<sup>6</sup> H. FREUND (Herausgeber), *Handbuch der Mikroskopie in der Technik*, Band I, Teil 1: *Allgemeines Instrumentarium der Durchlichtmikroskopie*, Umschau-Verlag, Frankfurt am Main 1957.

a) R. OPFER-SCHAUM, Mikroskop-Heiz- und Kühltische nebst Hilfsgeräten.

b) H. REUMUTH, Die Mikroskopie des Chemikers.

<sup>7</sup> D. GOLDSTEIN und C. STARK-MAYER, New Specific Test for Calcium, *Anal. Chim. Acta* 19 (1958) 437.

<sup>8</sup> L. KOFLER (†) und A. KOFLER, *Thermo-Mikro-Methoden zur Kennzeichnung organischer Stoffe und Stoffgemische*, 3. Auflage, Wagner, Innsbruck 1954.

<sup>9</sup> W. C. McCRONE, *Fusion Methods in Chemical Microscopy*, Interscience, New York 1957 (vgl. auch 14 a).

<sup>10</sup> A. G. E. PEARSE, *Histochemistry, Theoretical and Applied*. J. & A. Churchill Ltd., London 1953.

<sup>11</sup> H. SCHILDKNECHT und Mitarbeiter, Mikro-Zonenschmelzverfahren zur Reinigung organischer Substanzen, *Angew. Chem.* 68 (1956) 641. Eis-Zonenschmelzen, *Angew. Chem.* 69 (1957) 634. Ring-Zonenschmelzverfahren für organische Substanzen, *Z. Naturforsch.* 12 b (1957) 23.

<sup>12</sup> Union Internationale de Chimie: *Tableaux des réactifs pour l'analyse (qualitative) minérale*:

1938: Premier Rapport, Akademische Verlagsgesellschaft, Leipzig.

1945: Deuxième Rapport, Wepf & Cie., Basel.

1947: Troisième Rapport, Librairie Istra, Paris.

1950: Quatrième Rapport, Société d'Éditions de l'Enseignement,

Paris.

<sup>13</sup> F. WELCHER, *Organic Analytical Reagents*, 4 Volumes, D. Van Nostrand & Co., New York 1947/48.

<sup>14</sup> J. H. YOE und H. J. KOCH jr. (Editors), *Trace Analysis*. Papers presented at a Symposium on Trace Analysis held at the New York Academy of Medicine. John Wiley, New York 1957.

a) Chapter 4: W. C. McCRONE, Chemical Microscopy.

b) Chapter 5: F. FEIGL und PH. W. WEST, Spot Tests.