

227. Siegfried Skraup: Über Vitalfärbung mit einfachsten Farbstoffen und ihre Fixierung.

[Aus dem Chemischen Institut der Universität Würzburg.]

(Eingegangen am 1. August 1916.)

Einer häufigeren Anwendungsmöglichkeit der Vitalfärbung, d. h. der differenten Färbung von Protoplasmateilen lebender Organismen, die zur Untersuchung vieler biologischer und morphologischer Probleme von größter Bedeutung wäre, standen bisher wohl hauptsächlich zwei Umstände hindernd entgegen. Es zeigte nämlich eine große Zahl von Beobachtungen, namentlich an Einzelligen, daß bei dem natürlichen oder durch Gifte (Fixierungsmittel), wie Alkohol u. a., bewirkten Absterben vital gefärbter Objekte, das zur Fixierung und Überführung in Dauerpräparate nötig ist, die differente Färbung struktureller Plasmateile in eine diffuse der ganzen Zelle überging und schließlich mehr oder minder vollständig auswaschbar war. Von Versuchen, in denen das vermieden wurde, dürften nur die Konservierung der Methylenblau-Nervenfärbung von Ehrlich¹⁾ und die daran geknüpften Untersuchungen sowie die Fixierungen mit Formaldehyd der Goldmannschen Arbeiten²⁾ allgemein bekannt geworden sein, und gelegentliche Beobachtungen anderer Autoren³⁾, die zum Teil erst während dieser Arbeit aufgefunden wurden, haben die prinzipielle Bedeutung der Fixierungsmöglichkeit so wenig zum Bewußtsein der mikroskopisch arbeitenden Biologen gebracht, daß sich in deren wichtigstem Handbuch, der »Enzyklopädie der mikroskopischen Technik«⁴⁾, im Artikel »Vitale Färbung« Fischel dahin äußert, daß die Resultate mit den verschiedensten empfohlenen Fixierungsmitteln durchaus unbefriedigende sind, und es vielleicht von vornherein als aussichtslos zu bezeichnen sei, nach einer dauernden Fixierung für Vitalfärbung zu suchen.

Bei seinen Arbeiten »Über den Bau des Plasmas der niedersten Tiere«⁵⁾ fand nun P. Vonwiller im hiesigen Anatomischen Institut, daß sich die mit Neutralrot (I.), Methylenblau (II.), Brillantcresylblau (III.) und Bismarckbraun (IV.) an Protisten (Amöben, Paramäcien und besonders an Actinosphärien) erzielten Vitalfärbungen mit

¹⁾ Deutsche med. Wochenschrift 1886, Heft 4; Biologisches Centralblatt 6, 214 [1887].

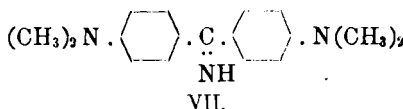
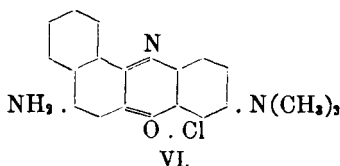
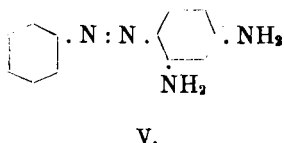
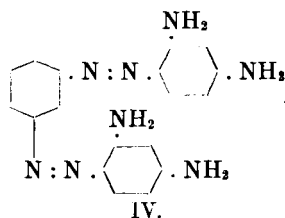
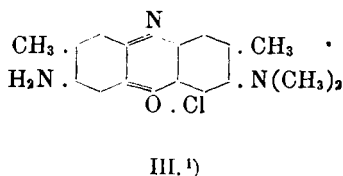
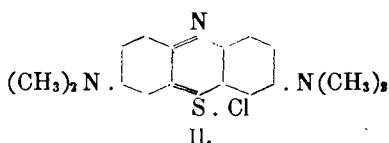
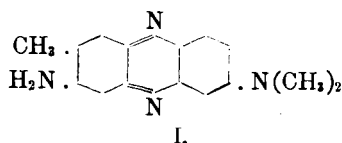
²⁾ Beiträge zur klin. Chirurgie 64, 192 [1909]; 78, 1 [1912].

³⁾ Przemicky, Biol. Centralblatt 14, 620 [1894]; 17, 321, 353 [1897]. Golovin, Zeitschr. f. wiss. Mikroskopie 19, 176 [1902]. Colombo, Zeitschrift f. wiss. Mikroskopie 20, 282 [1903].

⁴⁾ 2. Auflage, Berlin-Wien 1910, S. 597.

⁵⁾ Noch nicht veröffentlicht.

Sublimat fixieren und zum Teil in ganz üblicher Weise in Dauerpräparate überführen ließen.



Die weitgehende morphologische Ähnlichkeit der Färbungen und andererseits die große konstitutive Verschiedenheit des Bismarckbrauns (IV.) von den unter einander ja näher verwandten Phenazin-, Thiazin- und Oxazinderivaten (I.—III.) führte mich zur Vermutung, daß es das einzige gemeinsame Konstitutionselement, die NH_2 -Gruppe (bzw. $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ -Gruppe) sei, welches die gleichartige Reaktion mit dem Sublimat bedingte, zumal die bekannte leichte Bildung von Quecksilber-Stickstoff-Verbindungen das Entstehen schwer löslicher Additions- und besonders komplexer Substitutionsprodukte wahrscheinlich machte. Es wurde nun festgestellt²⁾, daß sich auch die mit Nilblau (VI.), Chrysoidin (V.), Auramin (VII.), *p*-Dimethylamino-azobenzol (X.), Anilingelb (Amido-azobenzol) (IX.) und einer Reihe anderer amidierter Farbstoffe (XI.—XIV.) erzielten Vitalfärbungen, über

¹⁾ Der amidierte Kern bei technischen Produkten wechselnd (z. B. durch den Benzylrest) substituiert; verwendet wurde Brillantcresylblau Grübler.

²⁾ Ich verdanke die Ausführung der mikroskopischen Versuche der Liebenswürdigkeit von Hrn. Dr. P. Vonwilder, der über die morphologischen Ergebnisse dieser Untersuchung besonders berichten wird.

die ich weiter unten noch in andrem Zusammenhang berichte, gleichfalls mit Sublimat fixieren lassen. Diese Methode ist also prinzipiell auf alle »basischen« Farbstoffe anwendbar; da mich eine Anzahl anderer Fragen zunächst mehr interessierte, wurde die Reihe der darauf geprüften Amidoverbindungen zurzeit nicht vergrößert.

Bei der riesigen Zahl bekannter Amin-Quecksilberverbindungen¹⁾ ist es einigermaßen auffällig, daß analoge Verbindungen mit Farbstoffkomponenten offenbar noch nicht beschrieben sind. Ein eingehenderes Studium derselben dürfte bei den bekannten unübersichtlichen Verhältnissen und Reaktionen der hierher gehörigen Substanzen kaum von besonderem Interesse sein, und so habe ich mich auch damit begnügt, durch Reagensglasversuche das Verhalten einiger Farbstoffe gegen Neßlers Reagens, gesättigte Quecksilberchloridlösung und Quecksilberchlorid-Kochsalz-Lösung (der Zusammensetzung Na_2HgCl_4 entsprechend) zu prüfen. Starke Niederschläge liefern so außer den zu genannten Vitalfärbungen verwendeten Farbstoffen z. B. noch Kristallviolett, Safranin, Thionin. Ein Unterschied im Verhalten gegen Quecksilberchlorid allein und gegen Sublimat-Kochsalz-Lösung trat bei diesen nicht auf; deutlich ist ein solcher wahrzunehmen, z. B. bei Brillanteresylblau und Nilblau, die mit Quecksilberchlorid allein keinen, mit der Natrium-Quecksilberchloridlösung starken Niederschlag geben. Dieser Unterschied konnte nicht etwa durch die aussalzende Wirkung des Natriumchlorids bedingt sein, da selbst eine konzentrierte Lösung desselben auf den Farbstoff fast ohne Wirkung ist, während eine noch sehr stark verdünnte Sublimat-Kochsalz-Lösung den Niederschlag erzeugt. Von Wichtigkeit war dann weiter, die Möglichkeit auszuschließen, daß das in diesen Lösungen stets vorhandene zweiwertige HgCl_4^{2-} -Ion auf das positiv-elektrische Farbstoffkolloid koagulierend wirke. In diesem Falle müßte die zur Fällung nötige Menge der Quecksilberlösung sehr gering sein und in keinem stöchiometrischen Verhältnis zur vorhandenen Farbstoffmenge stehen. Nun wurden aber zur Fällung von 0.20 g Nilblauchlorid (VI.) in ca. 50 ccm Wasser 7.0 ccm einer Sublimat-Kochsalz-Lösung verbraucht, die nach einer Gehaltsbestimmung 0.0633 g Hg enthielt. Somit sind auf 1 Mol. des Farbstoffs $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{ON}_3\text{Cl}$ gebraucht worden 0.516 Atome Hg, was genügend genau einem Verhältnis von 1 Mol. HgCl_2 auf 2 Amidogruppen im Farbstoffkomplex entspricht und auf eine Verbindung vom Typ des schmelzbaren Präzipitates, $2\text{NH}_3\cdot\text{HgCl}_2$, deutet. Gegen die Annahme einer Anionwirkung spricht auch der Umstand, daß Oxalat-

¹⁾ Siehe Gmelin-Kraut, Handbuch der anorgan. Chemie, V, 2. Abt. S. 879 ff.

Tartrat- oder Phosphatlösungen trotz ihrer mehrwertigen Anionen keine Fällung liefern.

Den überwiegend größten Teil der »sauren« Farbstoffe bilden Phenolderivate, für die eine allgemeine leichte Überführbarkeit in schwer lösliche Komplexe kaum möglich erscheint. Daß indessen die Bildung von Schwermetallphenolaten (Lacken) auch ohne Komplexbildung zur Fixierung einer Vitalfärbung genügt, zeigen Versuche mit Pigmentbraun (Naphthalin-azo- α -naphthol XVII.) und Benzol-azo- α -naphthol (XVI.), die sich mit Bleiacetat fixieren ließen und absichtlich gewählt wurden, da die Bildung von cyclischen Metalllacken¹⁾ (wie z. B. beim Alizarin) hier wohl als ausgeschlossen gelten darf, die einen der Fixierung von vornherein günstigen Spezialfall darstellen würde. Prinzipiell ist somit jede Vitalfärbung fixierbar, sobald das gewählte Fixationsmittel mit dem Farbstoff eine möglichst schwer lösliche Verbindung erzeugt. Wie weit sich dabei der störende Einfluß der in so zahlreichen Farbstoffen vorhandenen Sulfogruppe paralysieren läßt, möchte ich einer weiteren Veröffentlichung vorbehalten.

Der zweite Umstand, der eine vielseitigere systematische Anwendung der Vitalfärbung hinderte, ist die geringe Kenntnis irgendwelcher Kriterien darüber, welchen chemischen Bau ein Farbstoff besitzen müsse, um vitalfärbend zu sein. Es sind zwar recht spezielle Ansichten hierüber schon geäußert worden²⁾, doch hat die fast ausschließliche Benutzung der üblichen, technisch verwendeten Farbstoffe kein schrittweises, methodisches Variieren des Versuchsmaterials gestattet, so daß die Folgerungen vielfach nur in erster Annäherung richtig sein können. Zudem wurde ein wesentlicher Faktor erst aufgeklärt durch die wichtigen Arbeiten von Höber³⁾, Küster⁴⁾ und besonders von Ruhland⁵⁾ sowie von Goldmann (l. c.) und anderen⁶⁾, aus denen hervorgeht, daß für die Farbstoffaufnahme der physikalische (z. B. Kolloid-) Zustand der Farbstoffe grundlegende Bedeutung hat. Das Problem, von welcher chemischen Konstitution nun dieser erforderliche Zustand bedingt ist, wurde bisher kaum be-

¹⁾ Vergl. Pfeiffer, A. 398, 138 [1913].

²⁾ Fischel, Anatom. Hefte 52/53 [1901], zitiert von Schulemann, Arch. f. mikr. Anatomie 79, 223 [1912].

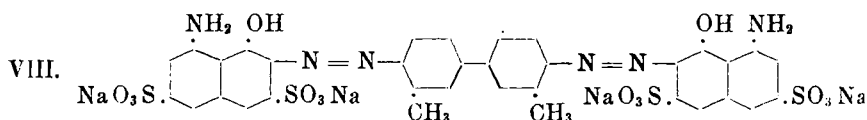
³⁾ Bio. Z. 11, 105 [1908]; 20, 56 [1909].

⁴⁾ Jahrb. f. wiss. Botanik 50, 261.

⁵⁾ Jahrb. f. wiss. Botanik 51, 376.

⁶⁾ Eine gute Übersicht über die erhaltenen Resultate findet sich in Höber, Physikalische Chemie der Zelle und Gewebe. 4. Aufl., Leipzig-Berlin 1914.

rührt. Eine gelegentliche Andeutung dieses Zusammenhanges zwischen Kolloidzustand und chemischem Bau findet sich bei Teague und Buxton¹⁾, die den viel geringeren Dispersitätsgrad des Nilblaus gegenüber dem des Methylenblaus auf den Unterschied des Oxazin- und Thiazinringes zurückführen wollen. An willkürlichen Modifikationen im Bau von Vitalfarbstoffen hat es trotzdem nicht gefehlt. Die chemotherapeutischen Arbeiten von Ehrlich, Mesnil und Nicolle²⁾ gehören hierher; in einer größeren Arbeit über Vitalfärbungsvermögen und chemische Konstitution hat W. Schulemann³⁾ eine Reihe von Benzidinderivaten und Verwandten des Trypanblaus (VIII.),



untersucht, doch ist es einleuchtend, daß die konstitutiven Einflüsse bei dem komplizierten Ausgangsmaterial in ihren Einzelfaktoren wenig klar geworden sind. Völlig unverständlich erscheint mir die Angabe von Przemicky (l. c.), der Actinosphären, Paramäcien u. a. mit Neutralrot, Nilblau, Methylenblau färbte und mit »durch Einführung verschiedener organisch-chemischer Stoffe, die auch als Bestandteile des Kerns und des Protoplasmas bekannt sind, modifizierten« Farben. Die Angaben von Schulemann⁴⁾, der »durch Änderung des Lösungszustandes negative Farben zu positiven gemacht« hat, sind bisher ohne den Beleg publizierter Versuche geblieben, so daß nicht einmal zu ersehen ist, ob es sich dabei um konstitutive Änderung, d. h. die Wahl anderer Farbstoffe, oder etwa Dispersitätsänderungen durch Zusätze oder dergleichen, wie sie unten beschrieben sind, handelt.

Entgegen den Ansichten von einem notwendig komplizierten Bau der Vitalfarbstoffe sei hier betont, daß auch die einfachsten Farbstoffe bei Protisten vitalfärbend sind, was um so wichtiger erscheint, als so an möglichst übersichtlichem Material die Einflüsse der konstitutionellen und physikalischen Faktoren zu prüfen sind.

Zur Methodik der Versuche sei hier bemerkt, daß ausschließlich die Färbungen an Protisten untersucht wurden, um auch die möglichst einfachen

¹⁾ Ph. Ch. 60, 480 [1907].

²⁾ Annales de l'institut Pasteur 20, Nr. 6/7.

³⁾ Parallelpublikationen im Ar. 250, 252 [1912] und in der Zeitschr. f. exp. Pathologie u. Therapie 11, 306 [1912]. Vergl. auch C. 1913, II, 1697.

⁴⁾ Jahresbericht der schlesischen Ges. f. vaterländ. Kultur 1913.

Organismen zu verwenden. Einzelversuche wurden mit Actinosphären, Amöben, Pelomyxen gemacht, alle irgendwie vergleichenden Versuche natürlich mit derselben Art, hauptsächlich mit Paramäcien der gleichen Kultur und (seltener) Opalinen, häufig waren auch Parallelversuche mit verschiedenen Arten. Die Lösungen der Amidoverbindungen wurden so angesetzt, daß 1 Tl. krystallisierten Hydrochlorids in 100 Tln. Wasser erwärmt, nach völligem Erkalten einige Stunden stehen gelassen und von der hydrolytisch abgeschiedenen Base filtriert wurde. Eine geringe Verschiedenheit in der Menge derselben blieb so unberücksichtigt, was um so weniger ins Gewicht fällt, als zur Färbung ja nur eine bakteriologische Platinöse bis ca. 1 Tropfen Farbstofflösung auf 2 ccm Wasser verwendet werden, so daß völlige Äquivalenz unnötig ist. Die Diffusionsfähigkeit der Farbstoffe wurde gemessen durch Überschichten einer 2—2½-prozentigen Gelatinegallerte (bei Vergleichsversuchen stets gleichzeitig hergestellt und verwendet, doch erwies sich diese Vorsicht als unnötig) im Reagensglas mit 2 ccm der Farbstofflösungen. Nach 24 Stdn. wurde die letzte noch erkennbare Färbungszone markiert und der Abstand vom Meniscus gemessen. Trotz der schwachen Färbung sind die Diffusionsstrecken auf $\frac{1}{2}$ —1 mm genau reproduzierbar und gut vergleichbar; das Alter der Gallerte zwischen 4 und 14 Tagen nach der Herstellung oder der Konzentrationswechsel von 2 zu 2½ % erwies sich als gleichgültig. Im Steighöhenversuch in Filtrierpapierstreifen¹⁾ zeigten sich die Farbstoffe, wie zu erwarten, als ausgesprochen positiv elektrisch.

Nach bekannten theoretischen Anschauungen ist eine Kombination einer sog. chromophoren mit einer auxochromen Gruppe genügend, einer Substanz Farbstoffcharakter zu verleihen. Unter den bisher als vitalfärbend bekannten Farbstoffen sind Monoazofarben wenig verwendet worden, doch ließ das ausgeprägte Vitalfärbungsvermögen und die leichte Fixierbarkeit des Chrysoidins (V.), das noch zwei auxochrome Gruppen enthält, die Hoffnung zu, selbst mit dem einfachsten Farbstoff, dem Aminoazobenzol oder Anilingelb (IX.), eine vitale Färbung zu erreichen, und in der Tat ist dies, wenn auch mit einer kleinen Einschränkung, der Fall. Brachte man nämlich Paramäcien in eine Lösung von Anilingelb, so wurde das ganze Tier gleichmäßig hellgelb ohne differente Färbung einzelner Protoplasmateile, und die Vermutung war naheliegend, daß die zu große Diffusibilität der Farbe eine Speicherung in einzelnen Partien hinderte. Diese Störung war dann dadurch einigermaßen zu beseitigen, daß das positive (s. o.) Kolloid durch Zusatz ein- oder besonders mehrwertiger Anionen einen geringeren Dispersitätsgrad und damit geringere Diffusionsfähigkeit erhalten mußte. Zum Versuch wurden gleiche Volumina Farblösung mit 1-prozentigen Lösungen von neu-

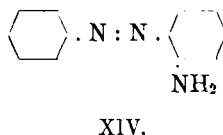
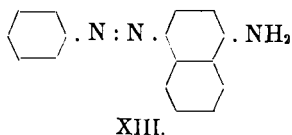
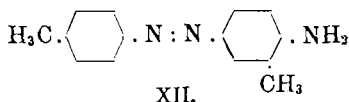
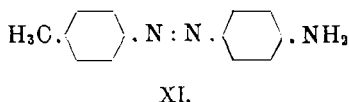
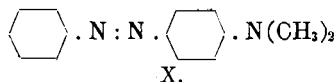
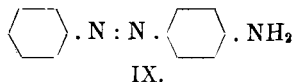
¹⁾ Siehe Ruhland, l. c. — Teague und Buxton, l. c. — Goppelsröder, Koll.-Zeitschr. 5 u. 6 [1910]. — Pelet-Jolivet, Die Theorie des Färbeprozesses, Dresden 1910, S. 120.

tralem Kaliumoxalat, Seignettesalz, primärem Kaliumphosphat (das sekundäre fällt bereits die freie Farbbase) gemischt; die erhaltenen Diffusionstrecken waren bei

Anilingelb + Wasser (Kontrolle)	Anilingelb + Oxalat	Anilingelb + Tartrat	Anilingelb + Phosphat
17 mm	17 mm	14 mm	12 mm.

Ebenso verringert Natriumcarbonat-Zusatz (durch Carbonat- oder Hydroxylionwirkung) die Diffusionsfähigkeit merklich, und es ergab sich auch im Färbungsversuch, daß nun eine leichte Differenzierung der Färbung eingetreten war, was bei Seignettesalz- oder Natriumcarbonat-Zusatz festgestellt wurde.

Dieser einen Möglichkeit, den für die Vitalfärbung so generell wichtigen¹⁾ Dispersitätsgrad eines Farbstoffs durch physikalisch wirkende Zusätze willkürlich zu variieren, steht die zweite gegenüber, durch Konstitutionsänderung einen solchen Einfluß auszuüben, die naturgemäß durch größere Vielseitigkeit und radikalere Eingriffe in das Farbstoffmolekül größere Differenzen im physikalischen Verhalten zu erreichen gestattet. Zu den weiteren Versuchen wurden nun herangezogen *p*-Dimethylamino-azobenzol (X.), *p*-Toluol-azo-anilin²⁾ (XI.), *p*-Toluol-azo-*o*-toluidin³⁾ (XII.), das sogenannte Naphthylaminrot, Benzolazo- α -naphthylamin⁴⁾ (XIII.) und *o*-Amino-azobenzol⁵⁾ (XIV.).



¹⁾ Außer der oben zitierten Literatur auch v. Möllendorf, Anat. Hefte 159, 80 [1915].

²⁾ Dargestellt nach B. 10, 666 [1877].

³⁾ Dargestellt nach Nietzki, B. 10, 665 [1877] und Michaelis und Erdmann, B. 28, 2196 [1895].

⁴⁾ Dargestellt nach Bamberger und Schieffelin, B. 22, 1381 [1889].

⁵⁾ Dargestellt nach F. H. Witt, B. 45, 2380 [1912]. Die Reduktion des Benzoyl-*o*-nitranilins nach der hier gegebenen Vorschrift mit 5-prozentiger Essigsäure gab mir das Ausgangsprodukt unverändert zurück, dagegen gelingt sie glatt mit 50-prozentiger Essigsäure.

Die Diffusionsstrecken waren für

IX.	X.	XI.	XII.	XIII.	XIV.
20	11	16	14	7	12 mm.

Sie sind nur als Vergleichswerte zu betrachten, da bei IX.—XII. und XIV. eine geringe (fast gleiche) Quellung der Gallerte zu beobachten war; diese dürfte der Wirkung der vorhandenen Salzsäure zuzuschreiben sein, deren quellungsbefördernden Einfluß beim Naphthylaminrot (XIII.) dessen geringerer Dispersitätsgrad paralysiert; kommt doch nach Traube¹⁾ hochkolloiden Farbstoffen merklich entquellende Wirkung zu. Die Mehrzahl obiger Farben gehört aber nach der Aufstellung von Teague und Buxton (l. c. S. 479) zu den wenig kolloiden, als Grenze etwa das »mäßig kolloide« Neutralrot mit der Diffusionsstrecke 14 betrachtet. Für ebenda als wenig kolloid bezeichnete Farbstoffe fand ich die Diffusionsstrecken: Methylenblau 18, Safranin 20, Chrysoidin 25, Bismarckbraun 16 und Eosin 19 mm.

Der geringeren Diffusionsfähigkeit entsprechend war bei diesen Farbstoffen auch die Differenzierung der Vitalfärbung deutlicher als beim Anilingelb, und besonders das Naphthylaminrot (das übrigens zuerst herangezogen wurde, als sich Anilingelb zu diffusibel erwies), ist praktisch recht brauchbar gewesen, besonders bei Actinosphären, wo zahlreiche Entoplasmakörner schön rot gefärbt werden. Während Anilingelb (IX.), wie schon erwähnt, für sich allein nur eine diffuse Färbung liefert, ist die Differenzierung der Färbung mit Dimethylamino-azobenzol (X.) etwas deutlicher. Die Einführung einer Methylgruppe in den Kern (Farbstoff XI.) übte einen noch günstigeren, merklich differenzierenden Einfluß auf die Vitalfärbung aus, namentlich die Entoplasmakörner von Paramäcien traten mit diesem Stoff leuchtend gelb gefärbt auf. Sehr interessant ist nun die starke physiologische Wirkung einer weiteren Methylgruppe, die sich beim *p*-Toluol-azo-*o*-toluidin (XII.) in *ortho*-Stellung zur Aminogruppe befindet. Diese Substanz tötete nämlich, in gleicher Konzentration (1 Tropfen auf ca. 2 ccm Wasser) wie Farbstoff XI. angewandt, die Paramäcien in etwa $\frac{3}{4}$ Stdn., während dieser stundenlang ohne Schädigung ertragen wird. Eine, natürlich entsprechend schwache, Färbung läßt sich mit Farbstoff XII. in geringeren Konzentrationen erzielen. Trotz der beträchtlich helleren Farbe der sauren Lösung des *o*-Amino-azobenzols (XIV.) der des *p*-Amino-azobenzols (IX.) gegenüber ist jenes für die Vitalfärbung dem letzteren wesentlich überlegen. Auch an diesem Beispiel ergibt sich somit der begünstigende Einfluß der Dispersitätsverringerung.

Die Färbungen mit allen diesen Stoffen lassen sich mit Sublimat-Kochsalz-Lösung fixieren, und daraus ist noch ein bedeutungsvoller

¹⁾ B. 48, 938 [1915].

Schluß auf die Bindungsart der Farbe am Protoplasma zu ziehen. Denn die hier verwendeten Substanzen enthalten je nur eine Aminogruppe, und diese erweist sich im gefärbten Objekt noch als frei für die Reaktion mit dem Quecksilbersalz. Als »haptophore Gruppe« im Sinne der bekannten Ehrlichschen Auffassungen¹⁾ kann sie somit nicht gewirkt haben, und die Bindung des Farbstoffmoleküls an den Protoplasmateil kann nicht mittels einer chemischen Reaktion zwischen diesem und der Aminogruppe erfolgt sein. Bei der weitgehenden Indifferenz der sonstigen Molekülbestandteile dieser Farbstoffe halte ich daher einen möglichst eindeutigen Beweis für die Auffassung der Farbstoffaufnahme bei der Vitalfärbung (und damit wohl der Färbung überhaupt) als Adsorption für erbracht. Der Einwand, es werde etwa eine primär vorhandene Verbindung zwischen Aminogruppe und Protoplasma durch die Einwirkung des Quecksilbersalzes gespalten, worauf die entstehende Farbstoff-Quecksilber-Verbindung als schwer löslich lokalisiert bleiben müsse, wird dadurch entkräftet, daß es in verschiedensten Versuchen immer wieder gelingt, den mit vorhandenem überschüssigem, d. h. nicht aufgezogenen Farbstoff entstehenden Niederschlag durch Wasser wegzuschwemmen (bei den verwendeten Protisten wenigstens), während die vorher different gefärbten Stellen dabei keinen Farbstoff abgeben. Dies ist z. B. selbst beim Chrysoidin (V.) der Fall, trotzdem dessen Quecksilberverbindung ganz außerordentlich schwer löslich ist, und bei dem eine chemische Verbindung zwischen Aminogruppe und Protoplasma gar nicht gelöst zu werden brauchte, wenn man annimmt, daß zur Reaktion mit dem Quecksilbersalz die vorhandene zweite Aminogruppe herangezogen würde. Bei der strukturellen Feinheit und Identität der Färbung vor und nach der Fixierung (als besonders schönes Beispiel nenne ich die Färbung mit Naphthylaminrot bei Actinosphären²⁾) wird namentlich dem Morphologen eine solche Vorstellung kaum angängig erscheinen.

Für die Annahme einer Adsorption des Farbstoffs spricht meiner Meinung nach auch die oben beschriebene biologische Empfindlichkeit für Konstitutionsunterschiede von einer Geringfügigkeit, die die Annahme verschiedener chemischer Reaktionen unter den gewählten Bedingungen nicht allzu wahrscheinlich macht, während für die Adsorption des ganzen Moleküls in erster Linie seine Gleichgewichtslage und Schwingungszustände in Betracht kommen, die naturgemäß von

¹⁾ Vergl. u. a. B. 42, 17 [1909].

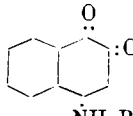
²⁾ Im Gegensatz dazu stehen Farbablagerungen besonders der Trypanblaureihe in Nierenzellen, deren Niederschlagsnatur ohne Bindung an präformierte Gebilde Schulemann (l. c.) wahrscheinlich gemacht und Möllendorf in einer mir während der Niederschrift dieser Arbeit bekannt gewordenen Publikation (Koll.-Zeitschr. 18, 81 [1916]) bewiesen hat.

viel feineren Strukturverhältnissen abhängig sein werden. Bei der großen Rolle primärer Adsorptionen für den sekundären Eintritt chemischer Reaktionen halte ich es für nicht ausgeschlossen, daß viele Fälle großer Reaktionserleichterungen oder -erschwerungen durch Substituenten hierher zu rechnen sind. Statt der Adsorption in den beschriebenen Fällen eine chemische Bindung etwa durch die Nebenvalenzen anzunehmen, die den Benzolkernen oder der Azogruppen-Doppelbindung zukommen¹⁾, erschiene mir etwas gezwungen bei dem festgestellten Freibleiben der so reaktionsfähigen Aminogruppe mit ihrem koordinativ ungesättigten Charakter.

Die hier beschriebenen Fälle der Fixierung einer Substanz unter Freilassen einer typischen »haptophoren« Gruppe scheinen mir auch zu einer vorsichtigeren Handhabung dieses Begriffs in unserer heutigen Chemotherapie zu raten. Es kann offenbar eine chemische Gruppe oder Konstitution einem Molekül Adsorbierbarkeit, »Organotropie« verleihen, ohne selbst — primär oder überhaupt — verankert zu werden.

Erwähnen möchte ich noch, daß derartige Quecksilberverbindungen (z. B. von Naphthylaminrot oder *p*-Dimethylamino-azobenzol) trotz ihrer Schwerlöslichkeit den charakteristischen Farbumschlag der quecksilberfreien Stoffe in saurem bezw. alkalischem Medium geben und zwar in vitro sowohl als am gefärbten und fixierten Objekt. Ob sich aus der Verfolgung dieser Beobachtung neue Gesichtspunkte zur Theorie der Indicatoren gewinnen lassen, soll untersucht werden. Bei der Auffassung des Farbumschlags als Umlagerungs- und Isomerie-Erscheinung²⁾ ist das unveränderte Verhalten der Quecksilbersubstitutionsprodukte auffällig, andererseits erscheint mir die Dispersitätsänderung als überwiegender Grund des Farbwechsels³⁾ schwierig zu vereinigen mit der Tatsache, daß noch die am Protoplasma fixierte Quecksilberverbindung als Indicator mit gleichen Farben wirkt, das hieße aber, Dispersitätsänderungen erführe von der Größenordnung der freien, nicht gefällten Farbstoffe.

Um eine weitere Reaktion zum Nachweis der unveränderten Aminogruppe anzuführen, kam die zu ähnlichen Zwecken verwendete⁴⁾ 1,2-Naphthochinon-

4-sulfonsäure⁵⁾, die Amino in Verbindungen vom Typ  überführt,

in Form ihres Natriumsalzes auf Paramäcien zur Wirkung, die mit Anilینگelb

¹⁾ Pfeiffer, A. 404, 1 ff., besonders S. 9 [1914].

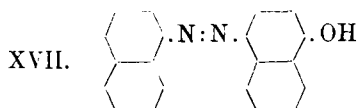
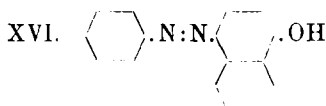
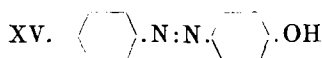
²⁾ Hantzsch, B. 48, 158 [1915]; 46, 1557 [1913]; 41, 1187 [1907] u. a. O.

³⁾ Wo. Ostwald, Koll.-Zeitschr. 10, 97 und 132 [1912].

⁴⁾ Ehrlich und Herter, H. 41, 379 [1904].

⁵⁾ Dargestellt nach Böniger, B. 27, 23 [1894], aber nach Witt und Kaufmann (B. 24, 3163 [1891]) in das Natriumsalz übergeführt.

oder Naphthylaminrot gefärbt waren. Mit Säuren konnte der Umschlag des unveränderten Farbstoffes darauf nicht mehr bewirkt werden, so daß die erwartete Reaktion offenbar eingetreten war; doch ist die entstandene Färbung unübersichtlich, da Paramäcien schon von dem naphthochinonsulfosauren Natrium allein gefärbt werden.



Zur Untersuchung der Azophenol-Farbstoffe wurden verwendet *p*-Oxy-azobenzol (XV.), Benzol-azo- α -naphthol¹⁾ (XVI.) und Pigmentbraun, d. i. Naphthalin-azo- α -naphthol²⁾ (XVII.).

Den Lösungen der Aminoverbindungen entsprechend, wurden die Kalium- (beim Oxy-azobenzol Natrium-) Salze mit 100 Tln. Wasser erwärmt und im übrigen analog verfahren. Die Diffusionsstrecken waren für

XV.	XVI.	XVII.
21 mm	12 mm	9 1/2 bzw. 12 mm.

Beim Steighöhenversuch zeigte Azophenol das typische Verhalten negativer Kolloide (es stieg das Wasser 111 mm, die Farbe 108 mm), bei Benzol-azo-naphthol stieg der Farbstoff nur 49 mm bei 112 mm Wasser, er war also merklich adsorbiert worden. Die Lösungen von Pigmentbraun zeigen starke Alterserscheinungen (wie sie z. B. auch bei Benzopurpurin beobachtet wurden³⁾). Die Diffusionsstrecke einer frisch bereiteten Lösung betrug 12 mm in deutlich roter Farbe, bei zweitägigem Stehen war die Lösung braun, diffundierte nur 9 1/2 mm, jedoch mit ganz blaßgelber Farbe, die nur die höchstdispersen Spuren der diffundierenden Substanz andeutet, während die Hauptmenge zu grobdispers geworden war, um überhaupt in das Gelatinegel einzudringen. Gleichzeitig ändert sich die Adsorbierbarkeit im Steighöhenversuch; bei einer Wassersteighöhe von 105 mm war frische Pigmentbraunlösung 13 mm, 48-stündige 36 mm gestiegen.

Seiner großen Diffusionsfähigkeit entsprechend färbte Benzol-azophenol (XV.) Paramäcien nicht merklich an. Benzol-azo- α -naphthol (XVI.) gab mit dem der Protozoen wegen nötigen Brunnenwasser starke Niederschläge (wohl infolge des Calciumgehaltes), so daß keine eingehenderen Versuche damit lohnend schienen. Immerhin wurde

¹⁾ Dargestellt nach Witt und Dedichen, B. 30, 2657 [1897].

²⁾ Sammlungspräparat; beschrieben von Frankland, Soc. 37, 752; D. R.-P. 5411.

³⁾ Schulemann, Zeitschr. f. exp. Path., l. c.

festgestellt, daß eine leicht differente Vitalfärbung zu erzielen, und diese, wie schon oben erwähnt, mit Bleiacetat fixierbar war. Eine schön differenzierte Färbung ergab die frische (rote) Pigmentbraunlösung (XVII.), während die zweitägige braune Lösung ohne Einwirkung war. Die Fixierung mit Bleiacetat verläuft glatt.

Für die Hydroxylgruppe dieser Azophenole gelten daher dieselben Überlegungen, wie sie oben (S. 2149) für die Aminogruppe angeführt wurden; auch diese einfachsten Farbstoffe werden adsorptiv gebunden, nicht durch Vermittlung des Hydroxyls.

Der beim Anilingelb und seinen einfachsten Derivaten gefundene dispersitätsverringende Einfluß der Methylierung konnte auch bei dem Fuchsin und seinen Methylderivaten gefunden werden (Diffusionsstrecken z. B. von Neufuchsin 18 mm, Methylviolett 4 R 17 mm, höher methyliertem Methylviolett 3 B 14 mm). Auch der große Abfall der Dispersität beim Übergang von Benzol- zu entsprechenden Naphthalinderivaten ist aus den obigen Diffusionsstrecken für Anilingelb: Naphthylaminrot, Benzol-azophenol: Benzol-azo-naphthol: Pigmentbraun klar ersichtlich; er möge noch erhärtet werden durch die Angabe der für Methylenblau (II.), Brillantcresylblau (III.) und Nilblau (VI.) gefundenen Diffusionsstrecken von 18, 23 gegen 6 mm. Damit wohl eher dürfte die oben von Teague und Buxton (l. c.) gefundene Differenz im Verhalten von Methylenblau: Nilblau zu erklären sein als mit der Verschiedenheit von Thiazin- und Oxazinring. Ein Parallelgehen der Vitalfärbbarkeit mit der Dispersität ist natürlich nur innerhalb enger Gruppen zu erwarten. Während beim Anilingelb und seinen Derivaten die Ausgangssubstanz mit der Diffusionsstrecke 20 mm schon zu diffusibel war, ergibt z. B. das durch die zweite Aminogruppe chemisch wesentlich verschiedene Chrysoidin trotz der größeren Diffusionsstrecke von 25 mm intensive und deutlich differenzierte Färbung.

Die vorliegende Untersuchung hat außer den angedeuteten noch manche interessante Ausblicke eröffnet, doch wollte ich die bisher erhaltenen Resultate veröffentlichen, da ich möglicherweise einige Zeit an der Weiterbearbeitung der hierher gehörigen Fragen verhindert sein werde. Kurz zusammengefaßt wurde bisher gefunden:

Jede vitale Färbung muß durch Überführung in eine möglichst schwer lösliche Verbindung fixierbar sein.

Es gibt keine spezifische chemische Konstitution, die einer Substanz vitalfärbende Eigenschaft verleiht, da auch die einfachsten Farbstoffe diese besitzen.

Für die Auffassung der Vitalfärbung und damit der Färbung überhaupt als Adsorptionserscheinung wurde ein chemischer Beweis an übersichtlichem Material erbracht.

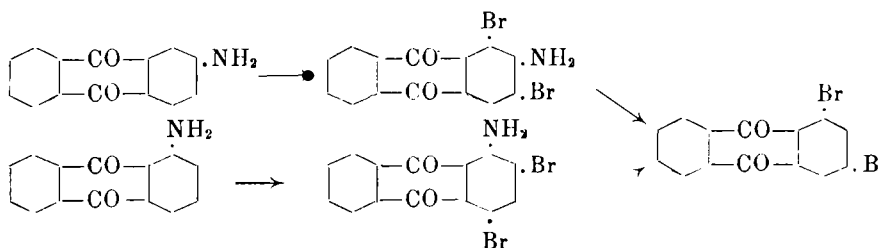
Der nach den bisherigen Arbeiten zur Färbung erforderliche Kolloidzustand erwies sich schon von feinsten Beeinflussungen der chemischen Konstitution abhängig.

228. Fritz Ullmann und Oskar Eiser: Über 1.3-Dibrom-anthrachinon.

[Mitteilung aus dem Technologischen Institut der Universität Berlin.]

(Eingegangen am 21. Juli 1916.)

Für die Herstellung des 1.3-Dibrom-anthrachinons kann sowohl 1- als auch 2-Amino-anthrachinon als Ausgangsmaterial dienen. Beide Produkte liefern bei der energischen Bromierung Dibromderivate, aus denen bei der Entamidierung das gleiche Dibrom-anthrachinon entsteht. Nach beiden Verfahren betragen die Rohausbeuten 95–96 % der Theorie, jedoch ist das aus dem 2-Amino-anthrachinon gewonnene Rohprodukt etwas reiner.



In dem 1.3-Dibrom-anthrachinon ist besonders das 1-ständige Bromatom sehr beweglich. Durch Behandeln mit Anilin bildet sich das rote 3-Brom-1-anilino-anthrachinon. Läßt man *p*-Toluolsulfamid in amylalkoholischer Lösung auf das Dibrom-anthrachinon einwirken, so entsteht das 3-Brom-1-*p*-toluolsulfamino-anthrachinon, das durch Verseifen mittels konzentrierter Schwefelsäure das rote 3-Brom-1-amino-anthrachinon liefert.

Auch Anthranilsäure reagiert nur mit dem 1-ständigen Bromatom unter Bildung von 3-Brom-1-anthrachinonyl-anthranilsäure (I.), die leicht in das entsprechende Acridon (II.) umgewandelt werden kann. Dies ist um so auffallender, da Ullmann und Sané¹⁾ ge-

¹⁾ A. 380, 336 [1911].