

63. Über den Einfluss des Methylenblaus auf die Atmung der Lebermitochondrien

von F. Leuthardt und B. Exer.

(26. I. 53.)

Die biologische Citrullinsynthese in den Lebermitochondrien wird durch den basischen Vitalfarbstoff Janusgrün (Diazingrün) gehemmt¹⁾. Wird die Aktivität gegen den Logarithmus der Farbstoffkonzentration aufgetragen, so ergibt sich eine leicht S-förmig gekrümmte Kurve, deren Form an eine Dissoziationskurve erinnert. Bei Sättigung der Mitochondrien mit dem Farbstoff, kenntlich an der Färbung der überstehenden Lösung nach Fällung der Suspension mit Trichloressigsäure, ist auch die Aktivität auf Null gesunken. Es scheint also, dass die Hemmung der Fermentaktivität, in diesem besonderen Fall der Citrullinsynthese, der Bindung des Farbstoffs an die Mitochondrien parallel geht und möglicherweise mit ihr in direktem Zusammenhang steht. Es stellt sich die Frage, ob das Janusgrün, das von den Cytologen zur spezifischen Anfärbung der Mitochondrien verwendet wird, eine spezielle Reaktion der Citrullinsynthese hemmt, oder ob es in den allgemeinen Stoffwechselprozess eingreift. Wir haben daher den Einfluss des Janusgrüns auf die Atmung der isolierten Granula (in einigen Versuchen auch auf die Succinoxidase) untersucht und gleichzeitig noch andere Farbstoffe in die Untersuchung einbezogen. Dabei hat sich gezeigt, dass bei genügend hoher Konzentration alle untersuchten Farbstoffe eine ähnliche Hemmwirkung wie Janusgrün zeigen. Verschiedene Farbstoffe, am ausgesprochensten das Methylenblau, können aber unter bestimmten Bedingungen die Atmung der Mitochondrien beträchtlich steigern. Wir berichten im folgenden über diese Versuche.

Fig. 1 zeigt die Konzentrationsabhängigkeit der Hemmung der Succinoxidase für verschiedene Farbstoffe (Janusgrün, Toluidinblau, Pyronin) bei einer Versuchsdauer von 30 Min. Bei genügend hoher Konzentration ist die Hemmung vollständig. Die Konzentration für 50-proz. Hemmung liegt bei ca. 10^{-5} Mol/l. Der zeitliche Verlauf der Sauerstoffaufnahme zeigt aber, dass es sich nicht einfach um eine Bindung des Farbstoffes an gewisse Elemente der Mitochondrien handeln kann, sondern dass ein viel komplexeres Phänomen vorliegt. Es zeigt sich nämlich, dass in den meisten Fällen die Hemmwirkung des Farbstoffes erst allmählich einsetzt. Zu Beginn, während den ersten 10–20 Min. des Versuches, ist die Atmung bei mittleren Farb-

¹⁾ F. Leuthardt & A. F. Müller, Exper. 4, 278 (1948).

stoffkonzentrationen (ca. 10^{-5} -m.) nur wenig herabgesetzt, oder sie ist sogar gegenüber der Kontrolle beträchtlich erhöht. Dieser letzte Effekt ist besonders ausgesprochen beim Methylenblau. Die Steigerung kann hier über 100% betragen (vgl. Fig. 2 und 3). Die einzelnen Mitochondriensuspensionen zeigen beträchtliche individuelle Unterschiede in ihrem Verhalten gegenüber dem Farbstoff. Die Aktivierung der Atmung durch Methylenblau lässt sich nicht immer reproduzieren. Wir werden auf diese Frage zurückkommen.

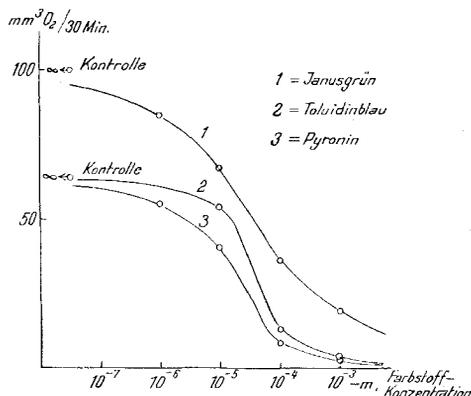


Fig. 1.

Hemmung der Succinoxidase durch Farbstoffe.

Als Fermentpräparat diente eine vierfach verdünnte Mitochondriensuspension (Leuthardt & Müller¹⁾) in isotonischem Mannit. Milieu von Schneider & Potter²⁾. Der Farbstoff wurde erst nach 10 Minuten aus dem Anhang zum Milieu zugekippt.

Die Analyse des Vorganges zeigt, dass sich offenbar zwei verschiedene Effekte des Farbstoffes überlagern, eine steigernde Wirkung, die sofort einsetzt, und eine Hemmung, die sich erst allmählich entwickelt. Die Steigerung der Atmung durch Farbstoffe ist keine vereinzelte Erscheinung. Barron & Harrop³⁾ haben 1928 beobachtet, dass Methylenblau die sehr geringe Atmung von Kaninchenerythrocyten in glucosehaltiger Lösung auf das 20fache steigert. Der Vorgang ist später von Warburg⁴⁾ genauer untersucht worden und hat schliesslich zur Entdeckung der wasserstoffübertragenden Fermente geführt. Auch an kernhaltigen Zellen lässt sich der Methylenblau-effekt beobachten, so an Vogelerthrocyten (Warburg⁴⁾) oder wie Barron & Hoffmann⁵⁾ nachgewiesen haben, an den Eiern von Seesternen. Die letzt-

¹⁾ F. Leuthardt & A. F. Müller, Exper. **4**, 278 (1948).

²⁾ W. C. Schneider & V. R. Potter, J. Biol. Chem. **149**, 217 (1943); ferner cit. in W. W. Umbreit, „Manometric techniques and related methods“. Burgess Publ. Comp., Minneapolis 1946, S. 95.

³⁾ E. S. G. Barron & G. A. Harrop, J. Biol. Chem. **79**, 65 (1928).

⁴⁾ O. Warburg, „Wasserstoffübertragende Fermente“. Cantor GmbH., Freiburg i.Br. 1949.

⁵⁾ E. S. G. Barron & L. A. Hoffmann, J. Gen. Physiol. **13**, 483 (1930).

genannten Autoren haben eine Reihe von Farbstoffen untersucht und dabei festgestellt, dass ihr Einfluss auf die Atmung deutlich vom Redoxpotential abhängig ist. Toluylenblau ($E_0 = + 0,115$ Volt), Methylenblau ($E_0 = + 0,011$ Volt) und Cresylblau ($E_0 = 0,035$ Volt; alle Potentiale bei pH 7,0) zeigten die stärkste Wirkung (Steigerung gegen 300 % der Kontrolle ohne Farbstoff). Bei Farbstoffen mit negativerem oder positiverem Redoxpotential als die obgenannten, ist die Wirkung bedeutend geringer. Die Erklärung für die Methylenblauwirkung liegt darin, dass Methylenblau die Oxydation der gelben Fermente durch Sauerstoff katalysiert (Warburg¹⁾):

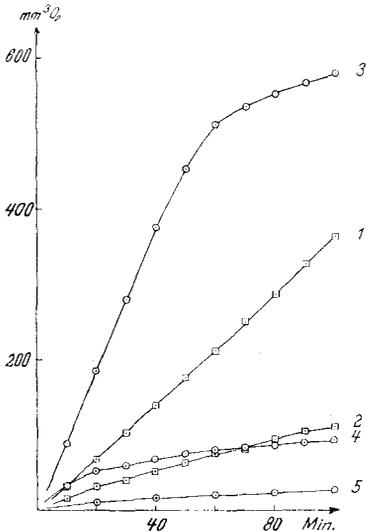
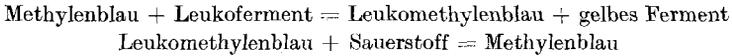


Fig. 2.

Wirkung des Methylenblaus auf die Pyruvatoxydation.

Milieu nach Leuthardt & Mauron²⁾. Endkonzentration des Farbstoffes 10^{-5} -m.

1. Kontrolle ohne Farbstoff, mit Substrat ($8,35 \cdot 10^{-3}$ -m. Pyruvat).
2. Kontrolle ohne Farbstoff ohne Substrat.
3. Substrat + Farbstoff im Hauptraum von Anfang an zusammen.
4. Substrat + Farbstoff nach 15 Min. aus dem Anhang zum Milieu zugekippt.
5. Leerwert ohne Substrat mit Farbstoff.

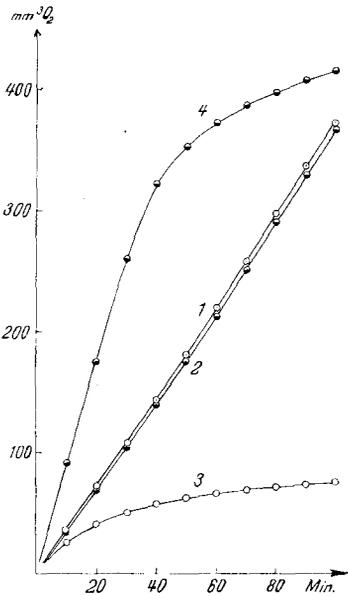


Fig. 3.

Methylenblau-effekt.

Milieu nach Leuthardt & Mauron²⁾. Substrat I ($8,35 \cdot 10^{-3}$ -m. Pyruvat), Substrat II ($8,35 \cdot 10^{-3}$ -m. Pyruvat + $8,35 \cdot 10^{-4}$ -m. Succinat). Endkonzentration des Methylenblaus 10^{-5} -m.

1. Kontrolle mit Substrat I.
2. Kontrolle mit Substrat II.
3. Farbstoff + Substrat I nach 15 Min. aus dem Anhang zum Milieu zugekippt.
4. Farbstoff + Substrat II nach 15 Min. aus dem Anhang zum Milieu zugekippt.

¹⁾ O. Warburg, „Wasserstoffübertragende Fermente“. Cantor GmbH., Freiburg i.Br. 1949. ²⁾ F. Leuthardt & J. Mauron, Helv. physiol. pharmacol. acta 8, 386 (1950).

An unserem Institut hat *Stachelin*¹⁾ versucht, diesen Mechanismus in den Mitochondrien dadurch direkt nachzuweisen, dass er die eisenhaltigen Fermente durch HCN blockierte; durch Zusatz von Methylenblau würde dann ein Nebenweg geöffnet und die Sauerstoffaufnahme teilweise wieder in Gang gebracht. Diese Versuchsanordnung führte bei den Mitochondrien nicht zum Ziel, weil dieselben keinen Eingriff in ihr Respirationssystem ertragen. Jede Hemmung des Stoffwechsels führt zur Quellung der Mitochondrien und schliesslich zu deren vollständigen Zerstörung. Wahrscheinlich hängt bei keinen bisher untersuchten Gebilden die morphologische Integrität so eng mit dem Stoffwechsel zusammen, wie bei den Mitochondrien. *Raaflaub*⁵⁾ hat dieses Problem eingehend untersucht.

Die zweite Wirkung des Farbstoffes, nämlich die Hemmung der Atmung, ist wahrscheinlich komplexer Natur. Die eben erwähnten Untersuchungen von *Raaflaub*²⁾ haben ergeben, dass die Mitochondrien bei Abwesenheit eines Substrats, das sie veratmen können, ihre Aktivität rasch verlieren. Diese Inaktivierung erfolgt bei Gegenwart von Methylenblau noch bedeutend rascher. Die Versuche wurden in *Warburg*-Manometern durchgeführt, wobei der Farbstoff entweder zu Beginn dem Hauptraum zugesetzt oder nachträglich aus dem Anhang eingekippt wurde. Ein typischer Versuch mit Pyruvat als Atmungssubstrat ist in Fig. 2 dargestellt. Im Kontrollversuch (Substrat von Anfang an zugesetzt) verläuft die Sauerstoffaufnahme während der ganzen Versuchsdauer linear. Wird das Methylenblau mit dem Pyruvat zusammen in den Anhang gegeben und nachträglich gekippt (15 Min. nach Versuchsbeginn), so nimmt die Sauerstoffaufnahme schon nach wenigen Min. stark ab, während bei nachträglicher Zugabe von Pyruvat allein (in Fig. 2 nicht dargestellt) nach dieser Zeit kaum eine Veränderung der Aktivität festzustellen ist. Wird Methylenblau zu Beginn ohne Substrat zugesetzt, so findet bei nachträglichem Einkippen des Substrats (nach 15 Min.) keine wesentliche Oxydation mehr statt; die Mitochondrien sind während der kurzen Zeit des Kontakts mit dem Farbstoff, bei Abwesenheit eines Atmungssubstrates, völlig inaktiviert worden.

Die Veratmung des Pyruvats durch die Lebermitochondrien wird im allgemeinen durch Zusatz von Succinat oder Fumarat nicht beschleunigt, wie dies im Muskel der Fall ist (*Leuthardt & Mauron*³⁾). Diese Tatsache wird durch die beiden mittleren Kurven in Fig. 3 illustriert. Wahrscheinlich enthalten die intakten Granula genügend Dicarbonsäuren, um den Citronensäurecyclus in Gang zu bringen. Wird dagegen Methylenblau zugesetzt, so hat das Succinat einen sehr

¹⁾ *F. Leuthardt & M. Stachelin*, unveröffentlichte Versuche.

²⁾ *J. Raaflaub*, *Résumés des Communications du IIe Congrès International de Biochimie*, Paris, Juli 1952, S. 41; wird in *Helv. physiol. pharmacol. acta* **11** (1953) erscheinen.

³⁾ *F. Leuthardt & J. Mauron*, *Helv. physiol. pharmacol. acta* **8**, 386 (1950).

starken Einfluss. Fig. 3 zeigt einen derartigen Versuch. Substrat und Farbstoff befanden sich hier im Anhang und wurden gleichzeitig eingekippt. Ohne Succinat bewirkt das Methylenblau schon während der zweiten 10-Minuten-Periode eine starke Abnahme der Atmung. Die Sauerstoffaufnahme ist nach 1 Std. auf den Wert von etwa $3 \text{ mm}^3 \text{ O}_2$ pro 10 Min. abgesunken (Kontrollwert $35 \text{ mm}^3/10 \text{ Min.}$). Bei Gegenwart von Succinat ruft dagegen Methylenblau eine starke Steigerung der Atmung hervor (94 mm^3 während der ersten 10-Minuten-Periode); die Sauerstoffaufnahme beginnt erst nach etwa 40 Min. deutlich abzusinken, d. h. der Eintritt der Hemmwirkung wird durch die Dicarbonsäure stark verzögert. Dieser Effekt des Succinats, wenn auch weniger ausgesprochen, tritt auch in Erscheinung, wenn der Farbstoff dem Hauptraum zugesetzt und das Substrat erst nachträglich zugekippt wird. Die gleiche Wirkung wie Succinat haben auch Citrat, Fumarat und α -Ketoglutarat. Wir verzichten darauf, diese Versuche durch Kurven zu illustrieren. Für die auffallende Wirkung der Dicarbonsäuren in Gegenwart des Methylenblaus lässt sich zur Zeit keine sichere Erklärung geben. Möglicherweise schädigt der Farbstoff die Mitochondrien derart, dass ihre Grenzschicht durchlässiger wird und die im Innern enthaltenen Dicarbonsäuren, eventuell auch gewisse Kofaktoren, in das Milieu entweichen lässt. Zusatz von Succinat, α -Ketoglutarat oder Citrat würde erneut den Ablauf des Citronensäurezyklus gestatten. Gleichzeitig wird damit die erhöhte Permeabilität das Eindringen des Farbstoffes und seine Reaktion mit den Fermentsystemen der Granula erleichtern.

Über die Natur der Methylenblauwirkung auf die Mitochondrien lassen sich nur Vermutungen äussern. Wir haben oben bereits erwähnt, dass jede Unterbrechung ihres oxydativen Stoffwechsels zur Zerstörung ihrer Struktur führt. Besonders wichtig für die Erhaltung ihrer Struktur scheint das Adenosintriphosphat zu sein. Man kann als Indikator für die Schädigung der Mitochondrien, wie *Raaflaub*¹⁾ gezeigt hat, ihre Quellung benützen. Durch Zusatz von ATP lässt sich auch bei Abwesenheit von Atmungssubstraten die Quellung während längerer Zeit verhindern (*Raaflaub*¹⁾). Alle Agentien, welche die Resynthese des ATP hemmen, werden daher auch zu einer Quellung und Desintegration der Granula führen. In reinem Sauerstoff verlieren die Mitochondrien ihre Aktivität rascher als in der Luft. Offenbar sind an ihrer Inaktivierung oxydative Vorgänge beteiligt, z. B. Oxydation von reaktiven Sulfhydrylgruppen in SH-Fermenten. Möglicherweise beruht die Wirkung der Redoxfarbstoffe z. T. darin, dass sie die Oxydation derartiger Gruppen katalytisch beschleunigen.

Für die Stabilität der Lebermitochondrien, und damit auch für ihr Verhalten gegen Farbstoffe, spielt ihr Gehalt an Substraten und Kofaktoren eine wesentliche Rolle. Wir

¹⁾ *J. Raaflaub*, *Résumés des Communications du IIe Congrès International de Biochimie*, Paris, Juli 1952, S. 41; wird in *Helv. physiol. pharmacol. acta* II (1953) erscheinen.

haben immer wieder beobachtet, dass die aus Lebern von gut gefütterten Tieren, besonders im Zustand der Verdauung gewonnenen Granula, gegen Schädigungen aller Art weniger empfindlich sind, als solche aus den Lebern fastender Tiere. Es ist daher auch verständlich, dass, wie wir oben erwähnt haben, die Grösse der beschriebenen Effekte auch bei anscheinend gleichen Bedingungen, nicht streng reproduzierbar ist. Um möglichst günstige Bedingungen herzustellen, haben wir unsere Versuchstiere mit einem Gemisch von B-Faktoren vorbehandelt, können aber nicht sicher angeben, ob dadurch tatsächlich ein geeignetes Versuchsmaterial erhalten werden kann, da wir keinen systematischen Vergleich zwischen behandelten und nicht behandelten Tieren angestellt haben.

Ähnliche Versuche wurden auch mit anderen Farbstoffen durchgeführt. Auch beim Janusgrün ist bei Gegenwart von Dicarbonsäuren eine leichte, atmungssteigernde Wirkung vorhanden. Sie erreicht aber bei einer Farbstoffkonzentration von 10^{-5} -m. nur etwa 20% gegenüber der Kontrolle (Redoxpotential von Janusgrün = $-0,257$ Volt, vgl. *Barron & Hoffmann*¹⁾). Etwas anderer Art scheint die Wirkung des Pyronins und Triphenyltetrazoliumchlorids zu sein. Hier zeigt sich keine Andeutung einer Atmungssteigerung. Während den ersten beiden 10-Minuten-Perioden ist im Gegenteil die Sauerstoffaufnahme eher kleiner als später. (Bei 10^{-5} -m. Farbstoffkonzentration und Pyruvat als Substrat, z. B. 11 mm³ von 0—10 Min., 20 mm³ von 50—60 Min. Entsprechende Werte für die Kontrolle ohne Pyronin: 25 mm³ und 36 mm³.) Pyronin kann sich mit Nukleinsäuren verbinden und wird daher in der Cytologie zur Färbung der Nukleinsäure enthaltenden Strukturen benützt. Man könnte also hier an eine Blockierung nukleinsäurehaltiger Strukturen durch den Farbstoff denken. Es ist völlig unbekannt, ob durch eine Bindung des Farbstoffs an die sauren Gruppen der Ribosenukleinsäure, die Fermentaktivität der Mitochondrien gehemmt werden kann. Die Hemmung der Succinoxidase durch Ribonuklease (*Potter & Albaum*²⁾, *Zittle*³⁾) kann hier nicht zum Vergleich herangezogen werden. Die Hemmung braucht hier nicht durch eine direkte Folge des Abbaues der Nukleinsäure zustande zu kommen, sondern könnte auch durch die Bildung stark hemmender Abbauprodukte erklärt werden. Nach *Schneider*⁴⁾ ist überhaupt die Hemmung der Succinoxidase durch eine Verunreinigung der Ribonukleasepräparate bedingt.

Experimenteller Teil.

Chemikalien. Methylenblauchlorid: *J. D. Riedel-de Haën*; Janusgrün B: *Farbwerke Hoechst*; Triphenyltetrazoliumchlorid: *Bayer*, Leverkusen; Pyronin, Base: *CIBA*, Basel.

Tiermaterial. Weisse, weibliche Ratten (eigene Zucht), die ausschliesslich Fleisch als Futter erhielten, wurden jeweils 24 Std. vor Versuchsbeginn auf Hunger gesetzt. Das Gewicht der Tiere betrug im Durchschnitt 270 g. Für die Versuche mit Methylenblau erhielten die Tiere vorher 0,5—2 cm³ Riboflavin (10 mg/cm³) oder je 0,2 cm³ Becozym eingespritzt.

¹⁾ *E. S. G. Barron & L. A. Hoffmann*, J. Gen. Physiol. **13**, 483 (1930).

²⁾ *V. R. Potter & H. G. Albaum*, J. Gen. Physiol. **26**, 443 (1942/43).

³⁾ *Ch. Zittle*, J. Biol. Chem. **162**, 287 (1946); *J. Franklin Institute* **241**, 154 (1946).

⁴⁾ *W. C. Schneider*, J. Biol. Chem. **164**, 241 (1946).

Methoden.

Darstellung der Mitochondrien: Es wurde die Methode von *Leuthardt & Müller*¹⁾ mit isotonischer Kaliumchlorid- und Mannitlösung verwendet.

Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs: Sie erfolgte manometrisch nach der Methode von *Warburg* bei 38° mit Luft im Gasraum.

Messung der Succinodehydraseaktivität: Bei der Durchführung von Hemmversuchen der Succinodehydrase mit Farbstoffen gelangte die Methode von *Schneider & Potter*²⁾ zur Anwendung. Als Fermentpräparat verwendeten wir 0,1 bzw. 0,2 cm³ einer vielfach verdünnten Mitochondriensuspension. Zur Hemmung benutzten wir die Farbstoffe Janusgrün B, Toluidinblau und Pyronin in Endkonzentrationen von 10⁻³—10⁻⁶-m. Die Farbstoffe befanden sich jeweils während der ersten 10 Min. (Temperatureinstellungszeit) im Seitenarm, bevor sie zum Milieu zugekippt wurden. Die Ablesungen erfolgten in Abständen von 10 Min.

Pyruvatoxydation: Das Versuchsmilieu wurde nach den Vorschlägen von *Leuthardt & Mauron*³⁾ hergestellt. Der Ansatz enthielt jeweils 0,6 cm³ eines 0,04-m. Phosphatpuffers mit einem pH von 7,42; 0,4 cm³ 0,1-m. Magnesiumsulfat; 0,3 cm³ ATP (10 Mikromol/cm³); 0,5 cm³ eines 0,05-m. Substrates; 0,3 cm³ Mitochondriensuspension; 0,4 cm³ einer 0,5-m. Kaliumchloridlösung; 0,3 cm³ der Farbstoffe in Konzentrationen von 10⁻² bis 10⁻⁵-m.; Wasser bidest. ad 3,0 cm³. Zur Absorption der Kohlensäure wurde Filterpapier in den zentralen Hohlzylinder gebracht und mit 0,4 cm³ 2-n. Natronlauge getränkt.

Als Substrate wurden Pyruvat, Fumarat, Succinat, Citrat und α -Ketoglutarat verwendet; daneben gelangte ferner Pyruvat in Mischung mit je einem der andern Substrate im Molverhältnis von 10:1 zur Untersuchung.

Durchführung der Farbstoffversuche: Nach den ersten 10 Min. Schütteln zum Temperatureausgleich wurden die Hahnen geschlossen und nach weiteren 5 Min. die erste Ablesung gemacht. Unmittelbar darauf wurde der Inhalt des Seitenarms zugekippt und nach 5 Min. (20 Min. Gesamtinkubationsdauer) wieder abgelesen. Die so ermittelten Werte wurden als Nullwerte angenommen.

Es gelangten folgende Farbstoffe zur Anwendung: Methylenblau, Janusgrün B, Pyronin und Triphenyltetrazoliumchlorid. Dabei wurde vor allem der Einfluss des Methylenblaus auf die Pyruvatoxydation untersucht. Für den sogenannten Methylenblau-effekt wurde eine Endkonzentration von Methylenblau von 10⁻⁵-m. verwendet.

SUMMARY.

1. The influence of several basic dyes on the oxygen consumption of liver mitochondria in the presence of succinate and pyruvate has been studied. The oxidation of succinate is strongly inhibited by dye concentrations above 10⁻⁴ m.

2. Addition of methylene blue (10⁻⁵ m) initially accelerates the oxidation of pyruvate, but after a variable time the oxygen consumption drops to very small values. This characteristic action of methylene blue is particularly evident when the substrate is composed of pyruvate and minute amounts of succinate, fumarate, α -ketoglutarate or citrate. In the absence of methylene blue these dicarboxylic acids have no influence on the rate of the pyruvate oxidation.

¹⁾ *F. Leuthardt & A. F. Müller*, Exper. **4**, 278 (1948).

²⁾ *W. C. Schneider & V. R. Potter*, J. Biol. Chem. **149**, 217 (1943); ferner cit. in *W. W. Umbreit*, „Manometric techniques and related methods“. Burgess Publ. Comp., Minneapolis 1946, S. 95.

³⁾ *F. Leuthardt & J. Mauron*, Helv. physiol. pharmacol. acta **8**, 386 (1950).

3. The analysis of this methylene blue effect shows that there must be two superimposed actions: a) an acceleration of the respiration, analogous to the stimulation of the erythrocyte respiration in the presence of methylene blue as described by *Barron & Harrop*; b) an irreversible damage of the mitochondria by the dye, resulting in the inactivation of the respiratory system.

Zürich, Physiologisch-chemisches Institut der Universität.

64. Über eine einfache Synthese von Flavylumfarbsalzen

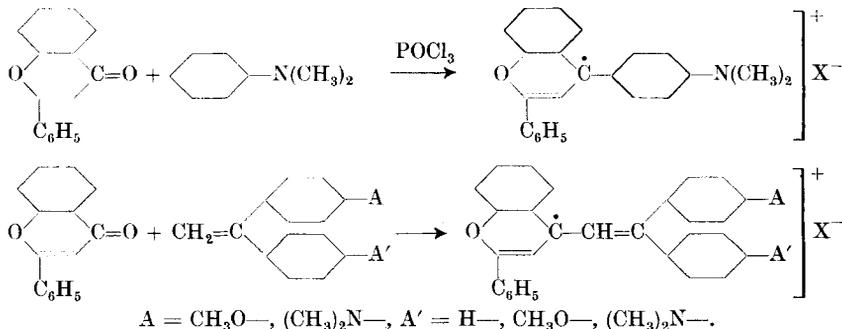
von R. Wizinger und A. Luthiger¹⁾.

(13. II. 53.)

Im Rahmen einer Untersuchung über Thiopyryliumsalze, bei welcher auch eine Anzahl Thioflavylumsalze erhalten worden war, erschien es wünschenswert, die analogen Farbsalze der Flavylumreihe zum Vergleich heranziehen zu können. Schon 1936 hatte der eine von uns gemeinsam mit Frl. Dr. A. Grüne in einer Reihe von Vorversuchen festgestellt, dass sich Flavylumfarbsalze leicht darstellen lassen durch Kondensation von Flavon mit tertiären aromatischen Aminen und mit Diaryl-äthylenen.

Wir haben nun einige dieser Farbsalze analysenrein gewonnen. Zur Kondensation genügt es, die Komponenten in Phosphoroxchlorid wenige Minuten zu erwärmen, dann wird in Eisessig aufgenommen und der Farbstoff mit wässriger Natriumperchloratlösung gefällt. Die Perchlorate lassen sich durchwegs gut umkristallisieren.

Als passive Komponenten verwendeten wir Dimethylanilin, Anisyl-phenyl-äthylen, Dianisyl-äthylen, Phenyl-p-dimethylaminophenyl-äthylen, Bis-(p-dimethylaminophenyl)-äthylen:



¹⁾ Über dieses Thema wurde bereits kurz berichtet auf der Sommerversammlung der Schweiz. Chem. Ges. in Luzern am 29. 9. 1951; vgl. *Chimia* **6**, 16 (Heft 1, 1952).