

## XVI.

### Über Fettfärbung.

**Farbchemische und histologisch-technische Untersuchungen.**

(Aus dem k. k. Hygienisch-bakteriologischen Institut der Jag. Univ. Krakau.)

Von

Dr. Philipp Eisenberg,

Assistenten am Institut.

---

In einer vorhergehenden Arbeit (Zentralbl. f. Bakt. I a. Orig. XLVIII B. H. 3. 1908), die sich mit der färberischen Darstellung der Fetteinschlüsse bei Bakterien befaßt, habe ich die Meinung ausgesprochen, daß es sich wohl verlohnend würde, die dort mitgeteilten neuen Fettreaktionen auch an anderem tierischen und pflanzlichen fetthaltigen Material zu prüfen. Vorliegende Mitteilung soll eben über die Untersuchungen berichten, die an menschlichen und tierischen Geweben in dieser Richtung ausgeführt wurden, während die an pflanzlichen Objekten gewonnenen Erfahrungen in einer noch folgenden Arbeit Platz finden werden, eine Einteilung, die durch die große histochemische Verschiedenheit des Materials wohl gerechtfertigt erscheint.

Bevor ich jedoch an die Besprechung meiner jetzigen Untersuchungen herantrete, halte ich es für angebracht, die Ergebnisse der Fettfärbung bei Bakterien hier kurz zu resümieren, einerseits deshalb, weil dieselben den Ausgangspunkt für die mitzuteilenden Versuche abgegeben haben, anderseits aber deshalb, weil ein Vergleich der an so heterogenen Objekten gewonnenen Resultate manches Interessante bieten dürfte.

Die Fetteinschlüsse bei Bakterien, die in Form von runden oder ovalen Tröpfchen bei vielen aëroben Bazillen sowie bei manchen Spirillen innerhalb des Zelleibs auftreten, sind schon seit langem von diversen Autoren mit verschiedenen Namen belegt, ihre Natur sehr verschieden gedeutet worden. Im Anschluß an A. Meyer und seine Schule sowie an Preisz glaube ich mit großer Wahrscheinlichkeit ihre Fettnatur behaupten zu dürfen und betrachte sie als Reservestoffe des normalen oder pathologischen Stoffwechsels,

vielleicht auch unter Umständen als Produkte einer Degeneration des Bakterienprotoplasmas.

Die Färbung dieser Fetteinschlüsse wird am besten an nichtfixiertem, lebensfrischem Material vorgenommen, an fixiertem gelingt sie selten und ist, sofern sie dies tut, recht mangelhaft. Von den klassischen Methoden erweist sich die Schwärzung mit Osmiumsäure als unanwendbar. Die Färbungen mit Sudan III und Dimethylamidoazobenzol (Buttergelb) geben wenig prägnante Resultate, während diejenigen mit Alkanin und Scharlach R (auch in der Herxheimer Modifikation) in meinen Händen ganz versagt haben.

Sehr schöne blaue Färbung liefert die von Diterich und Liebermeister dafür vorgeschlagene Naphtholblausynthese, die in verschiedenen Kombinationen ausgeführt werden kann, mit  $\alpha$ - $\beta$ -Naphtol, Phenol (nicht mit Orzin und Resorzin) sowie mit Dimethylparaphenylendiamin (nicht mit Nitrosodimethylanilin). Freilich muß ich es als sehr zweifelhaftinstellen, ob das dabei entstehende Reaktionsprodukt tatsächlich Naphtholblau ist, wie von den erwähnten Autoren sowie von Winkler angenommen wird und zwar aus folgenden Gründen. Das blaue Naphtholblausalz ist nämlich wasserlöslich und eignet sich als solches nicht zur Fettfärbung, dagegen ist die dazu geeignete alkohol- und fettlösliche Naphtholblaubase rotbraun. Versuche mit käuflichem Naphtholblau (Neublau, Naphthylenblau R; Baumwollblau) zeigen, daß die Fettgranula der Bakterien sich dagegen ablehnend verhalten und nur die braunrote Base (eventuell nach Sodazusatz freigemacht) aufnehmen. Dasselbe Verhalten zeigen die genannten Farbstoffe gegenüber tierischem Fett, ebenso ein synthetisch aus  $\alpha$ -Naphthol und Dimethylparaphenylendiamin in alkalischer Lösung hergestelltes Naphtholblau.

Man könnte also nur annehmen, daß die Granula aus Fettsäuren bestehen und daß die Naphtholblaubase sich mit denselben zum blauen Salz vereinigt, eine Annahme, der das Verhalten der Granula zu anderen Farbstoffen, z. B. Nilblau, Brillantkresyblau, Neumethylenblau widerspricht; es kommt nämlich dabei nicht die blaue Färbung der Fettsäuren, sondern die rote der Neutralfette zum Vorschein. Viel einfacher ist also die Annahme, daß wir hier eine Indophenolsynthese vor uns haben, die das schwach basische, wasserunlösliche, aber alkohol- und fettlösliche Indophenol entstehen und sich auf den Fettkugeln (physikalisch) fixieren läßt. Diese Annahme findet ihre Bestätigung in der schönen blauen Färbung, die mit käuflichem Indophenol erzielt wird, und die bez. der Nuance und Intensität mit der synthetischen Farbreaktion übereinstimmt.

Von anderen Oxazinen geben die Basen des Nilblausulfats (A), des Nilblauchlorhydrats BB, sowie des Brillantkresyblaus schöne orangefarbene Färbung der Fettgranula, dagegen versagten Neublau, Neumethylenblau, Capriblau, sowie die sauren Farbstoffe dieser Gruppe: Muskarin und Resorufin. Von den Azofarbstoffen habe ich mit Dimethylamidoazobenzol, Sudan III, Spritgelb, Sudan I, Sudanbraun, Manchesterbraun (Vesuvin B), mit den Basen des Vesuvins, Chrysoidins, Bismarckbrauns in alkoholischer Lösung die Fettgranula

färben können; Anilingelb, Sudan II, Janusrot, Indoin sowie Scharlach R (trotz der gegenteiligen Angabe von M e y e r ) gaben negative Resultate. Von anderen Basen eignen sich zur Färbung der Fetteinschlüsse diejenigen des Echtblaus B (Gemisch von Di- und Triphenylrosanilinsulfat) und des Spritindulins, sowie das Indophenol, das die Granula schön dunkelblau färbt.

Besondere Beachtung verdient aber eine Reihe von Färbungen, die die bisher besprochenen fast ausnahmslos an Prägnanz übertreffen und das gemeinsame Merkmal aufweisen, daß sie unter Mitwirkung gewisser Beizen vor sich gehen. Alle diese Beizen zeichnen sich einerseits durch Fettlöslichkeit aus, andererseits aber dadurch, daß sie mit gewissen basischen Farbstoffen wasserunlösliche aber alkohol- und fettlösliche Verbindungen geben, und darauf beruht eben der Mechanismus der in Rede stehenden Reaktionen.

Als solche Beizen können fungieren:  $\alpha$  und  $\beta$  Naphthol in alkalischer Lösung, Phenol, o Chlorphenol, Phenylazetat ebenfalls in alkalischer Lösung, Jod in Alkohol oder Glyzerin oder in L u g o l scher Lösung, Jodwasserstoffsäure, Pikrinsäure und ihre Salze, Trinitrokresol, Trinitroxylol, Trinitroresorzin, Trinitranilin, Trinitrobenzoësäure, Dinitrobenzol, p und m Nitrophenol, Pikrylchlorid, Pikraminsäure, Naphtholgelb, Viktoriagelb, Aurantia, Martiusgelb, Trinitrokresotinsäure, Salpetersäure 3 bis 100 %, salpetrige Säure, und (nach neueren Erfahrungen) Goldchlorid. Beziiglich der Farbstoffe, die hier Verwendung finden können, sei bemerkt, daß zunächst alle sauren Farbstoffe ausscheiden, von den basischen kommen in Betracht die Rosanilin- und Pararosanilinbasen und -salze, die diversen Rosanilin- und Pararosanilin-Violette und -Grüne, Rhodamin (nicht alle mit allen Beizen, darüber vgl. die Originalmitteilung). Daß die oben ausgesprochene Auffassung dieser Färbungsvorgänge das Richtige treffen dürfte, dafür spricht m. E. die Tatsache, daß die dort supponierten alkohol- und fettlöslichen Farbstoffverbindungen mit den Beizen nicht nur in den Bakterien, sondern auch in vitro hergestellt und zum Teil mit Erfolg zur Färbung der Fetteinschlüsse Verwendung finden können (die Pikrate und Jodverbindungen, nicht dagegen die Phenol- und Naphtholverbindungen). Im allgemeinen beobachtet man bei all diesen Beizenfärbungen die interessante Erscheinung, daß die Färbung der Fettgranula und des restlichen Bakterienleibes spez. reinen Ektoplasmas in einem gewissen Ausschließungsverhältnis zueinander stehen; die Färbung der Granula ist meist relativ elektiv und tritt die Färbung des Ektoplasmas erst bei Überfärbung ein; andererseits aber bleibt meist die Fettfärbung aus, wenn ein Farbstoff (nach vorheriger Beizung) bereits in schwacher Konzentration das Ektoplasma anfärbt.

Indem ich nun an die Mitteilung meiner neueren Untersuchungen über die Färbung von menschlichem und tierischem Fett herantrete, möchte ich vorausschicken, daß bis vor kurzem die Anzahl der Fettfarbstoffe eine recht beschränkte war. Wenn man von der Osmierung absieht, die eigentlich keine Färbung in engerem Sinne ist, bleiben nur Sudan III, Scharlach R, Alkannin und Indophenol als die praktisch brauchbaren, außerdem noch Tetramethyldi-

amidoanthrachinon (H e r x h e i m e r) und eine Reihe von Azo-farbstoffen, die mehr theoretisches Interesse bieten. Meine Untersuchungen bezweckten nun einerseits die Reihe der praktisch anwendbaren Farbstoffe zu erweitern, anderseits aber eben dadurch auch dem farbchemisch interessanten Problem der Fettfärbung näher treten zu können. Als Material für meine Untersuchungen benutzte ich hauptsächlich hochgradig verfettete menschliche Leber, daneben zur Kontrolle auch verfettete Organe von Meerschweinchen nach Formalinhärtung.

Zunächst ging ich daran, die Beizenfärbungen an menschlichem Fett nachzuprüfen, doch zeigte es sich zu meinem Erstaunen, daß weder mit Naphthol, noch mit Phenol-, noch mit Jod oder Pikrinsäure oder ihren Derivaten eine Färbung zu erzielen ist, es zeigt sich nämlich, daß das gebeizte Gewebe den basischen Farbstoff aufnimmt, nicht aber das Fett. Nur bei starker Beizung mit konzentrierter L u g o l s c h e r Lösung und Überfärbung mit Fuchsin erhält man eine schwarzrote Färbung des Gewebes und eine Rosafärbung des Fettes. Auch mit den fertigen kombinierten Farbstoffen, z. B. mit pikrinsaurem Rosanilin oder mit Jod-Fuchsin in alkoholischer (70 prozentiger) Lösung bekommt man keine Fettfärbung, indem nur das Gewebe sich anfärbt. Auf die Deutung dieses auffallenden Unterschiedes zwischen den Bakterien und tierischem Gewebe komme ich noch weiter unten zu sprechen.

An zweiter Stelle wandte ich meine Aufmerksamkeit verschiedenen Azo-farbstoffen zu, die bis jetzt am meisten zur Fettfärbung herangezogen wurden. Als allgemeine Vorbemerkung möchte ich vorausschicken, daß nur die basischen resp. die nach M i c h a e l i s „indifferenten“ oder „fast indifferenten“ (schwach sauren) Farbstoffe in Betracht kommen, während die sulfurierten von vornherein ausscheiden. Eine große Bedeutung für das farberische Verhalten der Azofarbstoffe hat ihre Wasser- resp. Alkohollöslichkeit; im allgemeinen sind freie Basen nur alkohollöslich (also auch die „indifferenten“ Farbstoffe), die Salze de: zur Salzbildung befähigten Basen mehr oder weniger wasserlöslich. Jedoch ist auch die Alkohollöslichkeit der Farbbasen ziemlich beschränkt, was leicht zu Niederschlagsbildungen führt und andererseits die Intensität der Färbungen meist beeinträchtigt. Von den verschiedenen Ratsschlägen, die darauf ausgehen, diese Löslichkeit zu erhöhen, scheint mir derjenige von H e r x h e i m e r besondere Beachtung zu verdienen, der einen Zusatz von 2% NaOH zur Lösung des Farbstoffs in 70 prozentigem Alkohol empfiehlt. Man kann auf diese Weise konzentriertere Lösungen erzielen, vielleicht erhöht auch das Alkali das Eindringungsvermögen der Farbe ins Fett. Die schwache Farbstoffkonzentration kann ferner freilich nur bis zu einem gewissen Grad durch längere Färbungsdauer kompensiert werden. Ein weiterer Übelstand der Azofarbstoffe besteht darin, daß die zur Fettfärbung befähigten meist helle Nuancen von Gelb durch Orange zu Rot aufweisen, dunkelrote und braune sind sehr selten, blaue und violette kommen gar nicht vor (vielleicht mit Ausnahme des Dianisidinblau, das mir nicht zur Verfügung stand).

Ferner kann man durch verlängerte Färbungsdauer die schwache Farbstoffkonzentration wettmachen, wenn man auch dabei Gefahr läuft, Farbstoffniederschläge im Präparat zu bekommen. Von alkohollöslichen Azofarbstoffen habe ich, außer den allgemein gebräuchlichen Sudan III und Scharlach R, folgende in alkoholisch-alkalischer Lösung (nach H e r x h e i m e r ) untersucht: Anilin-gelb (Amidazobenzol) (G)<sup>1)</sup> — kaum merkbare gelbliche Färbung, Buttergelb (Dimethylamidoazobenzol) (M) färbt gelb, Spritgelb (Base des salzsauren Amidoazobenzols) (G) grünlichgelb, Gewebe blaßgelblich, Sudan I (Anilinazo- $\alpha$  Naphthol) (G) schön gelb, Sudan II (Xylylidinazo- $\beta$  Naphthol) (G) tiefgelb, und zwar alle elektiv nur das Fett. Eine schöne Doppelfärbung gibt das Sudan RMP (A), indem das Fett tieforange, das restliche Gewebe schwach rosa erscheint. Besonders hervorheben möchte ich zwei Farbstoffe, die mit Scharlach R erfolgreich konkurrieren können, das Sudan IV (A. Konstitution noch nicht publiziert), das schön hochrot elektiv färbt, sowie Sudanbraun ( $\alpha$  Naphthylaminazo- $\beta$  Naphthol) (G und A), das eine Doppelfärbung gibt, indem Fett dunkelbraun, das Gewebe gelb gefärbt wird. Außerdem sind erwähnenswert: Gelb 2075 (B Anilin-Azo-Resorzin = Dioxyazobenzol) Fett orange, Gewebe gelb, Ei-gelb 1531 (Dimethylanilin-Diazobenzol B) blaßgrün-gelb nicht elektiv, Orange 1168 (B. Anilin-Azo  $\beta$  Naphthol) orange elektiv, Zinnoberrot 1233 (B. Konst. unbek.) tieforange elektiv, Scharlach R 1599 (B Konst. unbek.) scharlachrot elektiv, Rot 1169 (Xylylidin-Azo-  $\beta$  Naphthol B) zinnoberrot elektiv, Rot 1170 (B. Amidoazobenzol-Azo-  $\beta$  Naphthol) glänzend ziegelrot elektiv, Rot 1171 (B. Konst. unbek.) scharlachrot elektiv (recht schön!), Braun 1172 (B. Konst. unbek.) scharlachrot-grau gelblich (recht schön), Braun 1437 (B.  $\alpha$  Naphthylamin-Azo-  $\alpha$  Naphthol = Sudanbraun) schwarzbraun-grau gelb (sehr schön!). Weiter zeigte sich, daß eine Reihe von wasserlöslichen Chlorhydraten (also zur Salzbildung befähigte Farbstoffe) in wässriger Lösung das Fett metachromatisch färben. Man kann dabei feststellen, daß diese Fettfärbung immer im Farbton der Base erfolgt, man muß also wohl in Übereinstimmung mit den geistreichen neuesten Ausführungen von H a n s e n über die Metachromasie bei der Knorpelfärbung annehmen, daß die betr. Farbsalze in ihren wässrigen Lösungen hydrolytisch dissoziiert werden und die freie Base dank der Lösungsaffinität im Fett gespeichert wird. Wir werden weiter unten sehen, daß dieser Färbungsmodus sich auch in anderen Farbstoffgruppen wiederfindet und daß auf ihm einige der schönsten Doppelfärbungen für Fett beruhen. Bezuglich der technischen Details sei bemerkt, daß zuweilen bei einfacher Färbung der Schnitte in wässriger Lösung die Fettfärbung nicht eintritt, dagegen erscheint, wenn man auf den gefärbten Schnitt 1 bis 2 prozentige Sodalösung einwirken läßt, wobei ein Teil des im Gewebe gebildeten Farbsalzes dissoziert wird und

<sup>1)</sup> Die eingeklammerten Lettern neben den Farbstoffbezeichnungen bedeuten die Provenienz des betreffenden Farbstoffs und zwar (G) = G r ü b l e r , Leipzig, (M) = M e r c k , Darmstadt, (K) = K a h l b a u m , Berlin, (A) = A k t i e n - G e s e l l s c h a f t f ü r A n i l i n f a b r i k a - t i o n , Berlin SO. 36, (B) = W i l h . B r a u n s , Quedlinburg-Reichenberg.

die freigewordene Farbbase ins Fett hineindiffundiert. Zuweilen bedarf es dazu stärkerer Agentien in Form schwächerer oder stärkerer Lauge, manchmal bekommt man eine prägnante Fettfärbung nur bei Einwirkung der alkoholischen Lösung der durch Alkali freigemachten Farbbase. Selbstverständlich geben die letztgenannten Methoden auch dort, wo bereits in wässriger Lösung Doppelfärbung zustande kommt, noch augenfällige Färbungen. Chrysoidin (K) färbt Fett grünlichgelb, das Gewebe braungelb, Vesuvin gibt in wässriger Lösung keine sichtbare Fettfärbung, nach Sodaeinwirkung werden die Fett-tropfen grünlichgelb inmitten des braungefärbten Gewebes, färbt man mit alkoholischer (70 prozentiger) Lösung der Base, so erscheint das Fett grünlichgelb, das Gewebe gelbbraun.

Beim Bismarckbraun (G) findet man dasselbe Verhalten. Vesuvin B (m Toluylendiamindisazo-bi-m Toluylendiamin) (Manchersterbraun) (G) gibt dieselbe Färbung erst bei Verwendung der alkoholischen Basenlösung. Eine andere Marke von Vesuvin B bezeichnet als Bismarckbraun 1160 von W. Brauns, Reichenberg, gibt ebenso wie Chrysoidin bereits in wässriger Lösung rotbraune Fettfärbung und ähnliche Gewebsfärbung. Janusrot (Amidophenyltrimethylammoniumazoo-m Tolidinazoo- $\beta$  Naphthol) (G) gibt in wässriger Lösung blaßgelbe Färbung von Fett inmitten von rotbraunem Gewebe; durch Einwirkung von Lauge wird das Fett orangegelb, das Gewebe blaßt ab; färbt man mit der Farbbase, so bekommt man das Fett rotbraun, das Gewebe gelb. Janusblau (G) (Safraninazoo- $\beta$  Naphthol) färbt in wässriger Lösung das Fett blaßgelb, das Gewebe graublau, Janusgrün (G) (Safraninazoo-Dimethylanilin) das Fett orangegelb, das Gewebe blaugrün, mit ihren Basen konnte ich dagegen keine Fettfärbung erzielen. Neuphosphin (G) (Amidobenzylidimethylamin-Azo-Resorzin) färbt Fett gelb, das Gewebe gelbbraun, mit der Base blieb alles farblos. Tanninorange (Amidobenzylidimethylamin-Azo- $\beta$  Naphthol) (G) gibt eine orangegelbe nicht elektive Färbung, seine Base färbt das Fett gelb, das Gewebe gelbbraun. Lederbraun (Salz des Biparaphenyldiamin-Disazo-m Phenylendiamins) (G) färbt in wässriger Lösung nur das Gewebe gelbbraun, bei Einwirkung von Lauge erscheint das Fett blaßgelb, das Gewebe blaßgelbbraun, die Base färbt beides gelb. Mit Zerotin-Orange (G), Katechubraun (G) und Azophosphin (G) hatte ich nur negative Resultate zu verzeichnen, ebenso mit Indoin (G) (ob Azofarbstoff?).

Außer diesen käuflichen Farbstoffen, die mir zugänglich waren, habe ich eine größere Anzahl von Azofarbstoffen hergestellt, die zum Teil mir aus der Literatur bekannten Farbstoffen entsprechen; ob die anderen neuen Farbstoffe sind, wage ich angesichts der Hunderte von bereits dargestellten Körpern dieser Klasse nicht zu entscheiden (es standen mir nur die Lehrbücher von Nietzsche, Georgievius und Appenheim, sowie die Tabellen von Schultz und Julius, 3. Aufl., zur Verfügung). Ich diazotierte zumeist in alkoholischer Lösung und erhielt sodann durch Zusatz von Natronlauge direkt alkoholisch-alkalische Lösungen der betr. Azofarbstoffe. Chysoidin (Diamidoazobenzol = Phenylazo-m Phenylendiamin) gab schöne braune Färbung der Fettkugeln, graugelbliche Kontrastfärbung des Gewebes. Oxyazobenzol (Phenyl-

azobenzol) sowie Benzolazo-Resorzin gaben blaßgelbliche nicht differenzierte Färbung sowohl des Fettes als auch des Gewebes. Amidoazonaphthalin ( $\alpha$ -Naphthylamin-  $\alpha$ -Naphthylamin) gelbbraun-blaßgelb<sup>1)</sup>),  $\beta$ -Naphthol-  $\alpha$ -Naphthylamin (Karminnaphthe grénat) elektiv gelbbraun,  $\beta$ -Naphthol-Naphthylamin (Azotürkischrot) elektiv ziegelrot (rechtschön!),  $\beta$ -Naphthol-p-Nitranilin (Nitranilinrot) blaß orangegelb elektiv, Sudan G (Dioxyazobenzol == Anilinazo-Resorzin) grünlichgelb elektiv, Spritzgelb R (Amidoazotoluol) orangerot-blaßgelb. Die von mir hergestellten und in den oben erwähnten Zusammenstellungen nicht auffindbaren Azoverbindungen gaben folgende Resultate (alle in 70 prozentigem alkalierten Alkohol):

$\beta$ -Naphthol-Phenoxy- $\beta$ -Naphthylamin: gelbbraun elektiv,  
 $\alpha$ -Naphthol- $\beta$ -Naphthylamin: ziegelrot elektiv (rechtschön!),  
 $\alpha$ -Naphthol-Phenoxy- $\alpha$ -Naphthylamin: orangegelb elektiv,  
 $\alpha$ -Naphthol-Phenoxy- $\beta$ -Naphthylamin: orangerot (rechtschön!),  
 $\beta$ -Naphthol-Phenoxy- $\alpha$ -Naphthylamin: orangegelb elektiv,  
 $\beta$ -Naphthol-Phenoxy-m-Nitranilin: blaßgelb elektiv,  
m-Phenyldiamin-Dimethylparaphenylendiamin: gelbbraun elektiv,  
 $\beta$ -Naphthol-Benzidin: ziegelrot elektiv (rechtschön!),  
 $\beta$ -Naphthol-Tolidin: purpurrot elektiv (sehr schön!),  
 $\alpha$ -Naphthol-Benzidin: ziegelrot elektiv (rechtschön!),  
 $\alpha$ -Naphthol-Tolidin: gelbräunlich,  
Dinitronaphthol- $\alpha$ -Naphthylamin: blaßgelb elektiv,  
Phenol- $\alpha$ -Naphthylamin: hochrot elektiv (sehr schön!),  
Phenol- $\beta$ -Naphthylamin: ziegelrot elektiv (rechtschön!),  
Phenol-Phenoxy- $\alpha$ -Naphthylamin: orangerot elektiv,  
Phenol-Benzidin: blaßgelbbraun elektiv,  
Phenol-Tolidin: orangegelb-gelb,  
 $\alpha$ -Naphthol-Nitrosodimethylanilin: blaßrosa elektiv,  
 $\beta$ -Naphthol-Nitrosodimethylanilin: blaßgelb elektiv,  
Nitroso- $\beta$ -Naphthol-Nitrosodimethylanilin: blaßgelb elektiv,  
 $\alpha$ -Naphthol-Diphenylamin: orangegelb elektiv,  
p-Amidophenol- $\alpha$ -Naphthylamin: braunrot elektiv (rechtschön!),  
 $\alpha$ -Naphthol- $\alpha$ -Toluidin: purpurrot-gelb (sehr schön!),  
 $\beta$ -Naphthol- $\alpha$ -Toluidin: ziegelrot elektiv (rechtschön!),  
Tolidin- $\alpha$ -Naphthylamin: gelbbraun elektiv,  
Tolidin- $m$  Phenylendiamin: ziegelrot elektiv (rechtschön!),  
Benzidin-Tolidin: rotbraun elektiv (rechtschön!),  
Spritzgelb- $\beta$ -Naphthol-Tolidin: lachsrot elektiv (rechtschön!),  
Tolidin-Tolidin: orangegelb elektiv,  
Benzidin-Benzidin: leuchtend rotbraun-blaßgelblich (rechtschön!),  
Benzonaphthol- $\beta$ -Naphthylamin: orangegelb elektiv,  
Sudan IV-Tolidin: leuchtend rot elektiv (sehr schön!).

<sup>1)</sup> Die beiden durch - verbundenen Stoffe wurden nach Diazotierung gekuppelt; die ebenso verbundenen Farben bezeichnen die Färbung des Fettes resp. des Gewebes.

- $\beta$  Naphthol-Naphthalin: rotbraun-blaßgelb,  
 $\beta$  Hydronaphthochinon- $\beta$  Naphthol: gelbbraun leuchtend elektiv (recht schön!),  
 Benzidin- $\alpha$  Naphthylamin- $\beta$  Naphthol: hochrot-blaßgelblich (recht schön!),  
 Azetphenetidin- $\alpha$  Naphthylamin: leuchtend gelb-graugelblich,  
 Azetphenetidin-Tolidin: gruell gelbbraun elektiv.

Außerdem habe ich auch versucht, durch Diazotierung resp. darauffolgende Verkupplung solche Farbstoffe anderer Gruppen der Fettfärbung dienstbar zu machen, die weder als Salze noch als Basen Fett anfärben. Im Janusblau und Janusgrün haben wir bereits derartige Safranin-Azofarbstoffe kennen gelernt; mit Indoin (G) (ob identisch mit Indoindinblau-Safraninazo- $\beta$  Naphthol?) hatte ich nur negative Resultate, ein von mir hergestelltes Safraninazo- $\beta$  Naphthol gab eine Doppelfärbung bräumlichrot-blaßrosa, diazotiertes Safranin sowie Safranin-Azo-Phenol (Diazinschwarz) blaß violettblau-blaßrosa, Safraninazo- $\alpha$  Naphthylamin tiefbraun-gelbbraun (recht schön!), Safraninazo-p Amidophenol rotviolett nicht elektiv, diazotierte Neutralviolettblauorangebraun elektiv (recht schön!). Auch mit Azoverbindungen der Farbstoffe anderer Gruppen hatte ich positive Resultate zu verzeichnen. Rosanilin-Azo- $\beta$  Naphthol gab schöne elektive ziegelrote Färbung, die analoge Pararosanilinverbindung außerdem noch das Gewebe orange-rosa, Rosanilin-Azo- $\beta$  Naphthylamin rotbraun-blaßgelb, Rosanilin-Azo-Phenol blaßgelb-rosa, Alizarinengelb FS (Triamidodiphenyltolylkarbinoltrisazo-Salizylsäure = Rosanilin-Azo-Salizylsäure) blaßgelb-gelbbräunlich, Malachitgrün-Azo- $\beta$  Naphthol blaßgelb elektiv, dagegen gaben die entsprechenden Verbindungen des Hexamethylvioletts sowie des Anilinblau negative Resultate, ebenso diazotiertes Rosanilin und diazotierte Rhodaminbase, Auramin-Azo- $\beta$  Naphthol und Pyronin-Azo- $\beta$  Naphthol-Rhodaminbase-Azo- $\beta$  Naphthol färbt blaßgelb-rosa, Neutralrotbase-Azo- $\beta$  Naphthol elektiv gelb. Auch in der Thiazingruppe, in der weder Salze noch Basen an sich zur Fettfärbung befähigt sind, führte die Diazotierung zu schönen Fettfarbstoffen: als Repräsentanten wurden Methylenblau B pat. (G) sowie Toluidinblau (K und M) gewählt. Die diazotierte Methylenblaubase färbt rosa-graublau, die diazotierte Toluidinblaubase elektiv rot, Methylenblaubase- $\alpha$  Azo-Naphthol orange-blau, Toluidinblaubase- $\beta$  Azo-Naphthol rot-graublau, Methylenblaubase-Azo- $\alpha$  Naphthylamin orange-blau, Toluidinblaubase-Azo- $\alpha$  Naphthylamin gelbbraun-graugrünlich, Methylenblaubase-Azo-Tolidin rot-blau (sehr schön!), Toluidinblau-Azo-Tolidin rot-graublau (sehr schön!), Methylenblaubase-Azo-Salizylsäure orangerot-blaßblauviolett (sehr schön!), Toluidinblaubase-Azo-Salizylsäure orangebraun elektiv (recht schön!).

Endlich habe ich durch Einwirkung von Chinonen auf Hydrazine Azo-farbstoffe erhalten, die sich zur Fettfärbung eignen und zwar  $\alpha$  Naphthochinon-Phenylhydrazin (Benzolazo- $\alpha$  Naphthol): purpurrot-graugelblich (sehr schön!) sodann  $\beta$  Hydronaphthochinon-Phenylhydrazin: orangegelb-graugelblich.

Auch in der Gruppe der Nitrosokörper (Chinonoxime), die bisher bei der Fettfärbung kaum Beachtung gefunden hat, habe ich eine Reihe von Farbstoffen gefunden, die Fett anfärben, wenn auch zumeist die geringe Intensität dieser

Färbungen sie für die histologische Praxis ungeeignet erscheinen läßt. Das  $\alpha$  Nitroso- $\beta$  Naphthol (K entspricht dem Gambin Y in Teig s. Schultz-Julius, IV. Aufl. 512) färbt orangegelb elektiv, das  $\beta$  Nitroso- $\alpha$  Naphthol (von mir hergestellt = Gambin R in Teig Schultz - Julius 511) grünlich-gelb-graugelblich, Nitroso-Phenol (eigenes Produkt) gelb-braun, Nitroso-o-Kresol (eig. Pr.) gelb-graugelblich, Nitroso-p-Chlorphenol (eig. Pr.): gelb-grau-gelblich, Nitroso-p-Bromphenol (eig. Pr.) gelb-graugelblich, Nitroso-Xylenol 1 : 2 : 4 (eig. Pr.) grünlichgelb elektiv, Nitroso-Xylenol 1 : 4 : 5 (eig. Pr.) orangegelb elektiv.

Von den Azomethinen habe ich das einfachste Rubifuszin (Nietzki S. 84) durch Einwirkung von Diamethylanilin auf Nitrosodimethylanilin in salzsaurer Lösung dargestellt: es färbt blaßgrünlichgelb-graugelblich.

Die ausgesprochen sauren Nitrofarbstoffe sind zur Fettfärbung nicht befähigt, ebensowenig andere Nitroderivate von diversen Phenolen und Aminen.

Von den Diphenylmethanfarbstoffen habe ich Auramin (K) sowie Pyronin (G) untersucht; weder die Farbstoffe selbst, noch ihre Base, noch auch ihre Antiformin- oder Formalinderivate (s. w. u.) eignen sich zur Darstellung des Fettes.

Auch die Triphenylmethanfarbstoffe sind als solche direkt dazu nicht brauchbar und zwar weder die diversen Rosanilin- und Pararosanilinsalze, noch die verschiedenen Anilinviolette und Anilingrüne, noch ein Formaldehydderivat des Rosanilins (Nietzki, S. 155), noch die Rhodamine, noch weniger natürlich die verschiedenen hierher gehörigen Rosol-Phtalein- und Sulfosäuren. Auch die Basen der basischen Abkömmlinge des Triphenylmethans entbehren des Fettfärbungsvermögens. Nur die Basen der Phenyl- und Diphenylnaphthyl-derivate machen eine Ausnahme: von den erstenen gaben die Basen des Anilinblau (G), Reginaviolett (G), Blau 78 (RR spl) (B) (= Triphenyltromo- und Pararosanilinsalze) und Echtblau B (M) (Gemenge der Sulfate des Di- und Triphenylrosanilins), von den zweiten diejenigen des Viktoriablau B (G), Viktoriablau 4 R (M), Nachtblau (G), Blau BBB 74 (B) (= Phenylotetramethylotriamido- $\alpha$  naphthyldiphenylkarbinolchlorhydrat) (in 70 prozentigem Alkohol) eine orange-rosa elektive Fettfärbung, während das Gewebe entweder ungefärbt bleibt oder ganz blaßblau erscheint. Werden die so gefärbten Schnitte in Wasser aufbewahrt oder in Sirup eingeschlossen, so sieht man nach 12 bis 24 Stunden die Färbung der Fettkugeln allmählich ablassen (sie können unter Umständen auch gänzlich entfärbt werden, während gleichzeitig das Gewebe immer intensiver blau resp. violett sich färbt. Das ebenfalls hierher gehörende Diphenylaminblau (= Bayrischblau spritlöslich, von mir aus Diphenylamin und Oxalsäure hergestellt) gab kein eindeutiges Resultat, indem wegen seiner mangelhaften Löslichkeit in 70 prozentigem Alkohol seine Färbungsintensität sich als zu gering erwies. Das erwähnte Echtblau B (M) gibt schon direkt in 70 prozentigem Alkohol eine Doppelfärbung, indem das Fett gelb, das Gewebe blaßviolett gefärbt wird, Sodazusatz verstärkt die Intensität der Fettfärbung.

Weitere Versuche zeigten nun die interessante Tatsache, daß es durch verschiedene chemische Einwirkungen gelingt, manche der an sich zur Fett-

färbung nicht tauglichen Triphenylmethanfarbstoffe so zu verändern, daß ihre Base das Fett anfärbten. Ein solches Mittel fand ich vor allem im Natriumhypochlorit; versetzt man eine wässerige Fuchsinlösung mit Antiformin (alkalische Lösung von Natriumhypochlorit von O. Kühn, Berlin C.), so erhält man den Niederschlag einer Base, die in 70 prozentigem Alkohol eine schöne Doppelfärbung gibt: das Fett orangegelb, das Gewebe rosarot. Mit eben-solchem Erfolg kann man an Stelle des NaClO das CaClO sowie frisches Chlorwasser verwenden. Durch Einwirkung von Bromwasser entsteht ein Derivat, dessen Base blaßgelb-rosa färbt. Durch Jodeinwirkung (in Form von L u g o l-scher Lösung) entstehende Derivate haben farblose Basen. Welcher Art die beschriebenen Umwandlungen der Rosanilinbase sind, läßt sich ohne Analyse dieser Derivate natürlich nicht entscheiden; man könnte entweder an Halogen-substitutionsprodukte oder an Oxydationsprodukte denken. Zu dieser letzteren Annahme sei bemerkt, daß es mir durch Einwirkung anderer oxydierender Agentien (Jodsäure, Chlorsäure, Kaliumpermanganat, Chromsäure, Wasserstoffperoxyd) nicht gelungen ist eine fettfärbende Rosanilinbase zu bekommen. Andrerseits aber ist dadurch natürlich die Annahme einer Oxydationswirkung seitens der Halogene nicht ausgeschlossen, indem in den letzthin erwähnten Fällen vielleicht farblose Basen resultieren (etwa wie die Rosanilin- oder Pararosanilinbase), die sich im Fett ebenso lösen könnten, wie jene gefärbten. Diese Möglichkeit ist natürlich auch für andere Farbstoffe zuzugeben. deren Basen farblos oder zu schwach gefärbt sind (Rosanilin, Pararosanilin, Neufuchsin, Methylviolett, Malachitgrün, Rhodamin usw. — darüber weiter unten). Dafür spricht auch die Tatsache, daß das Chlorderivat des Pararosanilins (die Base) nur mehr grünlichgelb, das Bromderivat kaum merkbar gelblich färbt, das Jodderivat ist farblos. Ebenso färben die Halogenderivate des Kresofuchsins (G), des Methylvioletts (G) und Malachitgrüns (A) kaum merkbar gelblich, die Chlorderivate des Äthylvioletts (G), des Rhodamins B (K) und G (B) sind als Basen farblos. Dagegen verhalten sich die Derivate des Neufuchsins (B) und des Rosanilinvioletts färberisch ebenso, wie diejenigen des Fuchsins.

Von den Phthaleinen ist nur ein basischer Farbstoff zu erwähnen, das Chinolingelb spritlöslich (B), das elektiv blaßgrün färbt.

Von den Anthrachinonfarbstoffen habe ich Alizarin und Alizarin-Zyanin, beide ohne Erfolg untersucht. Interessant wäre aus noch zu erörternden Gründen die Untersuchung der Oxazime des Anthrachinons (Georgievics S. 209), die mir leider vorläufig nicht zur Verfügung stehen.

Von den Chinolinfarbstoffen erwies sich außer dem schon erwähnten Chinolingelb das Chinolinrot (G) und seine Base als Fettfarbstoff nicht verwendbar, ebenso das Zyanin (auch seine Base) im Übereinstimmung mit Michaelis und entgegen den Behauptungen von Ranvier. Das von mir hergestellte Flavanilin (Georgievics 241) erwies sich als zu farbschwach, um beurteilt zu werden. Auch die Akridinfarbstoffe Akridinorange (G), Akridinrot (G) und Phosphin (G) gaben mitsamt ihren Basen negative Resultate. Durch Behandlung von Akridinorange mit Formalin (der Farbstoff wird

in Formalin gelöst und kurz erhitzt, sodann durch NaOH die Base gefällt) konnte ich dagegen einen Farbstoff erhalten, dessen Base blaßgelb-gelbbräunlich färbt (Georgievics S. 247). Aus Zyanin erhält man bei solcher Behandlung eine Base, die schön grünlichgelb-blau aus Phosphin eine Base, die nicht elektiv blaßgrünlichgelb färbt, während beim Chinolinrot der Eingriff zu keinem Fettfarbstoff führt.

In der Thiazingruppe finden wir ähnliche Verhältnisse vor, wie in der Triphenylmethangruppe. Weder die Farbsalze noch die Farbbasen sind an sich befähigt, das Fett zu färben. Es wurden hier untersucht: Methylenblau B pat (G), Toluidinblau (K und M), Azur I (G), Methylenviolett (G und M), Methylengrün (G und M), Gentianin (G), Aethylenblau (G), Thionin (G). Dagegen gelingt es auch hier durch eine Reihe von Einwirkungen, sei es auf die Gewebsschnitte, sei es auf die Farbstoffe selbst, Fettfärbungen und zwar zum Teil recht instruktive, zu erzielen. Wenn man auf einen mit Methylenblau gefärbten Schnitt, der dunkelblaues Gewebe und farblose Fettkugeln präsentiert, eine verdünnte Antiforminlösung einwirken läßt, so sieht man nach einer gewissen Zeit die Fettkugeln blaßorange bis orangerot sich färben, während die Gewebsfärbung etwas abblaßt. Mit Toluidinblau bekommt man auf diese Weise das Fett rot, die Gewebe blau, mit Thionin orangerot-blau, mit Methylenviolett blaßorangegegelb-blaßviolett, mit Methylengrün blaßorangegegelb-farblos, mit Äthylenblau blaßrosa-farblos, mit Azur I rosarot-blau, mit Gentianin ist die Fettfärbung unsicher. Die Tatsache, daß auch genau neutralisierte Antiforminlösungen die gleichen Resultate geben, wie die ursprünglichen alkalischen, zeigt, daß die Alkaliwirkung hier kaum in Betracht kommt, höchstens, daß sie das Freiwerden der Farbbasen begünstigt. Weiter kann man sich davon überzeugen, daß auch Chlorkalklösungen sowie Chlorwasser dieselbe Änderung der Färbungen bewirken. Es lag nun nahe, auch die Wirkung anderer Halogene daraufhin zu untersuchen; tatsächlich gab Bromwasser ähnliche Ergebnisse, nur ist die erhaltene Nuance meist heller, beim Methylenblau gelb-blaugrün, beim Toluidinblau orange-grün, Jod (als solches oder in Form von Lugscher Lösung) gibt negative Resultate, es sind die Basen der resultierenden Farbstoffe farblos; die Versuche mit Fluor verboten sich von selbst. Es wurde sodann versucht mit Hilfe von anderen Oxydationsmitteln zur Fettfärbung zu gelangen, und auch diese Versuche waren von Erfolg gekrönt. Auf mit den verschiedenen Thiazinfarbstoffen gefärbte Schnitte wurde  $H_2O_2$ -Lösung (Perhydrol Merrick) aufgetropft, dabei änderte sich die Färbung nicht, erst wenn Alkali zugesetzt wurde, färbten sich allmählich die Fettkugeln im Farbenton der Base: beim Methylenblau bekam ich auf diese Weise rot-violett, beim Toluidinblau ebenso, beim Methylenviolett lachsrosa-rotviolett, beim Methylengrün blaßgelbbraun-farblos, beim Äthylenblau gelbrosa-farblos, beim Gentianin blaßgelbrosa-farblos, beim Thionin waren die Resultate unsicher. Auch die oxydierende Wirkung der Chromsäure erwies sich als geeignet, behandelt man ungefärbte Schnitte mit Chromsäure (wässrige oder alkoholische Lösung) und sodann mit Methylenblau oder Toluidinblau, so bekommt man wie gewöhnlich das Gewebe blau resp. blauviolett, das Gewebe farblos, läßt man aber jetzt

Alkali einwirken, so wird das Fett orangerot. Endlich fand ich auch im Formaldehyd ein Mittel, um Thiazinfarbstoffe „lipotrop“ zu machen (so mögen die zur Fettfärbung befähigten Farbstoffe benannt werden). Wird der ungefärbte Schnitt kurz mit Formalin behandelt, sodann mit Methylenblau gefärbt (man kann auch einfach in einer Farbstofflösung in Formalin färben), so bekommt, man das Gewebe blau, das Fett farblos; läßt man nun starke Lauge zufließen, so färbt sich das Fett schön erdbeerfarben („fraise“), das Gewebe schön braun; Toluidinblau gibt unter diesen Umständen glänzend rosenrot-braunrot.

Um nun zu entscheiden, ob all die geschilderten Färbungen eine Einwirkung der betr. Agentien auf das Gewebe oder auf den Farbstoff zur Grundlage haben, habe ich zunächst diese letztere Möglichkeit einer experimentellen Prüfung unterzogen und dabei tatsächlich Farbstoffe erhalten, deren Basen „lipotrop“ sind. Es wurden die wässerigen Lösungen der basischen Thiazinfarbstoffe mit Antiformin, Chlorkalklösung bzw. Chlorwasser behandelt, sodann mit Alkali die betr. Base gefällt und in 70 prozentigem Alkohol gelöst; so verändertes Methylenblau färbt orangerot-blau, Toluidinblau rot-blau, Gentianin rotviolett-blau, Äthylenblau rosaviolett-blau, Methylenviolett gelb-blau, Methylengrün blaßgelb-blaßorange. Die Behandlung mit Brom gibt hellere zum Teil schon farblose Basen, Jod liefert farblose Basen. Nach Einwirkung von Chromsäure färbt Methylenblau (Base) blaßorange-blaßblau, Toluidinblau ebenso, die Behandlung mit  $\alpha$ -Naphthochinon gibt Farbstoffbasen von dunklerer Nuance. Sehr schöne Färbungen ergeben ebenfalls die Produkte, die man durch Behandlung von Methylenblau bzw. Toluidinblau mit Jodsäure bzw. Chlorsäure (chlorsaures Kali und Schwefelsäure) erhält; die betr. Toluidinblauderivate geben als Basen eine der schönsten Doppelfärbungen: orangerot-blauviolett. Dagegen färben die Derivate der Behandlung mit Wasserstoffperoxyd bzw. mit Übermangansäure das Fett nur ganz undeutlich.

Von den Indaminen gibt Phenylblau (G) in wässriger Lösung eine schöne Doppelfärbung: gelb-violett, die Base in alkoholischer Lösung färbt grünlichgelb. Indaminblau (G) und Bindscheidlers Grün (G) sind weder als Salze noch als Basen zur Fettfärbung befähigt. Mit Antiformin behandelt, gibt Indaminblau einen Farbstoff, dessen Base Fett elektiv blaß rosaviolett färbt, das Formalinderivat gibt negatives Resultat, vielleicht weil die alkoholischen Lösungen wegen der geringen Löslichkeit zu farbschwach sind. Bindscheidlers Grün gibt bei diesen Einwirkungen Derivate, deren Basen farblos sind. Toluylenblau, das ebenfalls hierher gehört, habe ich mir bis jetzt nicht verschaffen können.

Von den Indophenolen ist das Handelsprodukt zuerst von H e r x - h e i m e r in die Mikrotechnik eingeführt worden und zeichnet sich durch seinen dunklen, auffallenden Farbenton als Fettfarbstoff sehr vorteilhaft aus. Sodann habe ich durch Einwirkung von Antiformin auf eine alkalische Lösung von Dimethylparaphenyldiamin Chlorhydrat und Phenol; die blaugrüne alkoholische Lösung des Niederschlags (s. N i e t z k i S. 185) färbt violett-blaßgrünlichblau, das blauviolette Filtrat elektiv violett. Ein durch alkalische Oxydation von Dimethylparaphenyldiaminchlorhydrat und Xylenol 1 : 2 : 4 erhaltenes Indophenol färbte in alkoholischer Lösung (von grünlichblauer Farbe)

elektiv blaßgelb, ein durch alkalische Oxydation von Amidophenol und Anilin hergestelltes Rotbraun mit schwarzen Rändern — gelbbraun, ein durch Einwirkung von Phenol auf  $\alpha$  Nitroso- $\beta$  Naphthol erhaltenes rotbraun-graubraun, ein durch Einwirkung von Phenol auf Nitrosophenol in alkalischer Lösung hergestelltes gelbbraun-schwarzbraun. Durch gemeinsame alkalische Oxydation von p Amidophenol mit Anilin bekam ich ein Produkt, das blaßgelblich-graubraun färbte. Mit dem aus Bindscheiders Grün hergestellten Indophenol (Nietki S. 183) konnte ich zu keinem eindeutigen Färbungsresultat gelangen.

In der Gruppe der Oxazime finden wir eine Reihe interessanter und für die Fettfärbung wichtiger Farbstoffe. Vom Meldolaschen Naphtholblau standen mir zwei Handelsproben zur Verfügung: das Neublau (G) sowie das Naphthyleneblau R in Kristallen (G). Das letztere gibt in wässriger Lösung eine schöne Doppelfärbung: gelb-violett, die alkoholische Basenlösung färbt orangerot-blaßviolett, das erstere färbt in wässriger Lösung nur das Gewebe blau, die Base gelb-blaßviolett. Vom Nilblau gibt die Marke A (Sulfat G) in wässriger Lösung keine Doppelfärbung erst nach Zusatz einer Spur von Soda wird das Fett orangerot, das Gewebe blau, die Base färbt elektiv orangerot. Die Marke BB (Chlorhydrat G) gibt bereits in wässriger Lösung eine schöne Doppelfärbung: orangerot bis purpurfarben-blau, die Base färbt intensiv orangerot. Diese schöne Färbung habe ich vor etwa einem Jahre zur Färbung der Fetteinschlüsse bei Bakterien verwendet; erst nachträglich erfuhr ich aus dem Anhang des Schmidschen Handbuchs, daß bereits ein Jahr zuvor Lorrain Smith den Farbstoff für die menschliche Histologie empfohlen hatte. Capriblau (G) färbt in wässriger Lösung nur das Gewebe blau, auch nach Sodazusatz erscheint keine Fettfärbung, erst die Färbung mit alkoholischer Basenlösung ergibt eine Doppelfärbung: blaß orangerosa-blaßblau. Das Brillantkresyblau (G) färbt in wässriger Lösung nur das Gewebe blau, nach Soda-wirkung bekommt man Orangegeißel-Blau. Das Kresylechtviolett (G) verhält sich ähnlich, nur ist hier die Gewebsfärbung violett. Muskarin (G) gab entsprechend seinem mehr sauren Charakter negative Resultate. Hierher gehört endlich wahrscheinlich auch ein Farbstoff, den ich durch gemeinsame Oxydation von Dimethylparaphenyldiamin mit Phenol in alkalischer Lösung (mittels Ferri-zyanium) erhielt und der in alkoholischer Lösung eine sehr schöne Doppelfärbung: rotbraun-grauschwarz gibt.

In der hier sich wohl anschließenden Gruppe der Zyanamine finden wir vor allem das Neumethylenblau (G), das in wässriger Lösung sich zu Doppelfärbungen eignet, indem es orangegeißel-blau färbt. Ein durch Einwirkung von Anilin auf Naphtholblau (Neublau) erhaltenes Zyanamin färbt in alkoholischer Lösung rotbraun-blaßgelb (sehr schön!). Durch Einwirkung von Diphenylamin auf Neublau in alkoholischer Lösung entstand ein Farbstoff, der rotbraun-graugrünlich (recht schön!), dieselbe Kombination in wässriger Lösung gab eine Färbung: gelb-violett (recht schön!). Metaphenyldiamin gab bei Einwirkung auf Neublau in alkoholischer Lösung ein Zyanamin, das elektiv gelbbraun färbt. Die Behandlung von Neublau mit alkoholischer Lauge führte zu einem Farbstoffe, der gelbe Fettfärbung gibt. Das Anilinderivat des Muskarins, das Echtgrün (G) gab wie jenes negative Resultate.

Von den Oxazonen gaben Resorzinblau (G) Gallozyanin (G), Gallamin-blau (G), Prune (G), Lackmoid (G), zwei von mir hergestellte Phenozyanine (mit Phenol und Resorzin) sowie von mir hergestelltes Nitrosoblau (S ch u l t z - J u l i u s 575) entsprechend ihrem sauren Charakter negative Resultate. Dimethylzirufamin (N i e t z k i S. 207) färbt in alkoholischer Lösung grünlich-gelb-blaßgelblich. Die Delphinblaubase (Einwirkung von Anilin auf Gallozyanin, keine Sulfurierung: G e o r g i e v i c h S. 263) färbt recht schön-orangegelb-blau, das analoge o-Toluidin-Einwirkungsprodukt sehr schön rot-blau, die entsprechenden Zölestinblauderivate färben schön orangerot-blaßblau, die Prunederivate erdbeifarben elektiv bzw. rotviolett elektiv, keine Färbung gaben die Muskarin-Derivate (Echtgrün). Mit Gallanilblau (ebenda) hatte ich kein positives Resultat zu verzeichnen. Mit einigen von mir hergestellten L i e - b e r m a n n s c h e n Farbstoffen, die sich hier anschließen, hatte ich ebenfalls durchgehends negative Resultate.

Das Oxazimiderivat Neuechtblau (G) gibt in wässriger Lösung eine prachtvolle Doppelfärbung: orangerot-blau, seine Base in alkoholischer Lösung eine noch schönere: bordeauxrot-blaßblau. In der Azingruppe wurde zunächst von den Eurrhodinen das Dimethyleurrhodin (erhalten durch Erhitzen von Diazo-Neutralrot in Alkohol, N i e t z k i S. 220) geprüft; die Base färbt in alkoholischer Lösung grellgelb-rostbraun (recht schön!). Neutralrot (G) färbt weder an sich noch als Base, läßt man aber auf die gefärbten Schnitte Antiformin oder alkalische Chlorkalklösung oder Chlorwasser oder Bromwasser oder Perihydrol einwirken, so färbt sich das Fett grünlichgelb, das Gewebe gelbbraun. Eine ähnliche Färbung bekommt man mit den Basen der Chlor- und Bromderivate, dagegen versagt das Formalin-Einwirkungsprodukt. Neutral-violett (G) läßt in wässriger Lösung das Fett ungefärbt, die Einwirkung von Alkali auf solche Schnitte gibt gelb-orangegelb, die Base in alkoholischer Lösung orangegelb-blaßgelb, die Base des Antiforminproduktes elektiv orangegelb.

Von den Safraninen färbt Phenosafranin (G) in wässriger Lösung nur das Gewebe orangerot, nach Alkalizusatz färben sich allmählich die Fettkugeln blaßrosa, die alkoholische Basenlösung färbt blaßrosaviolett-blaßrosa. Das Safranin O wasserlöslich (G) gab weder in wässriger Lösung noch als Base Fettfärbung, die Behandlung der gefärbten Schnitte mit Antiformin ergibt rosa-blaßgelbbraun, mit Chlorkalk gelb-gelbbraun, mit Chlorwasser gelb-rot. Mit dem Antiformin-Derivat des Phenosafranins erhielt ich eine blaßrosa-un-differenzierte Färbung, dasjenige des Safranin Osch. zeigte sich unwirksam. Amethystviolett (G) verhält sich dem Phenosafranin, dessen Tetraäthylderivat es darstellt, analog, indem die in wässriger Lösung gefärbten Schnitte nach Alkalieinwirkung orangegelb-gelb erscheinen. Ähnlich verhält sich Fuchsia (G), das Dimethylsafranin. Das Echtneutralviolett (G) gibt sowohl in wässriger als auch in alkoholischer Basenlösung eine schöne Doppelfärbung: gelb-violett. Von mir hergestelltes Nigramin (S ch u l t z - J u l i u s 613) färbte als Base elektiv gelb.

Von den Mauveinen gibt Rosolan (G) in wässriger Lösung eine schöne Doppelfärbung: orangegelb-rot, eine noch schönere das Indazin (G), ebenfalls

in wässriger Lösung: gelbgrün-schwarzblau. Das einfachste Mauvein, das Phenomauvein Violanilim (G) färbt weder in wässriger noch in alkoholischer Basenlösung, dagegen erwiesen sich die Basen seiner Oxydationsprodukte als lipotrop: die Base des Antiforminderivates färbt blaßorangebraun elektiv, die Base des Formalinderivats ziegelrot elektiv, diejenige des Chromsäurederivats blaßorange-graugelblich. Von den Naphthosafraninen färbt Magdalaret echt (G) (ein anderes Produkt derselben Firma ohne die Bezeichnung „echt“ erwies sich als saurer Farbstoff) in wässriger Lösung Fett nicht an, dagegen die alkoholische Basenlösung elektiv rosa, wobei die Fettkugeln dunkelrot gefärbte Ränder aufweisen; in Wasser entfärbten sich allmählich die Fettkugeln, und es bleiben nur die gefärbten Ränder zurück. Werden in wässriger Lösung gefärbte Schnitte mit Antiformin behandelt, so kommt eine Doppelfärbung zustande: rosa-gelb. Baslerblau (G) färbt weder in wässriger Lösung noch als Base, die Base des Formalinderivats färbt blaßorange-blauviolett, diejenige des Antiforminderivats gab kein eindeutiges Resultat.

Von den Aposafraninen färbt Neutralblau (G) in wässriger Lösung gelb-graubraun, Indulin-Scharlach (G) gibt in wässriger Lösung und als Base negative Resultate. Sein Antiforminderivat färbt als Base intensiv ziegelrot-blaßrot (recht schön!), das Formalinderivat als Base orangegelb-rot, das Bromderivat als Base ziegelrot-graugelblich (recht schön!), mit dem Chromsäurederivat keine Färbung. Ein von mir aus Phenozafranin hergestelltes Aposafranin (Nietzki S. 238) färbt als Base fleischfarben-rot.

Von den Indulinen färbt Sprit-Indulin (G) in 70prozentigem Alkohol gelblich-graublau, Nigrosin spritlöslich (G), in ebensolcher Lösung blaßgelb-graublau, Nigrosin spritlöslich (M) orangegelb-graublau (sehr schön!), Indulin 241 (B) blaßbraunviolett-blauschwarz, Tiefschwarz spritlöslich 2752 (Nigrosin B) braunschwarz-orangerosa; unter Alkalieinwirkung werden alle diese Fettfärbungen intensiver, während die Gewebsfärbungen ablassen. Paraphenylenblau (G) färbt Fett weder in wässriger Lösung noch als Base; die Base des Antiforminderivats färbt blaßrosa-graugrünlich, diejenige des Formalinderivats blaßrosaviolett elektiv, diejenige des Chromsäurederivats blaßerdbeerfarben-grauviolett. Azetinblau (G) färbt direkt nur das Gewebe blau, nach Alkalieinwirkung bekommt man gelbrotviolett. Chlorhydrinblau färbt direkt blaßgelb blau, nach Alkali wird die Fettfärbung intensiver. Ein nach Art des Parablau (Schultz-Julius 637) durch Erhitzen von m Phenylendiamin mit Sprit-Indulin erhaltenes „Metablau“ färbt als Base rotviolett-blaßgrauviolett. Durch chromsaure Oxydation des Spritindulins (G) erhielt ich einen Farbstoff, dessen Base gelbblau-schwarzbraun färbt.

Von den Chinoxalinfarbstoffen färbt Flavindulin (G) in wässriger Lösung Fett nicht an, die Base gibt nur undeutliche Resultate. Dagegen geben verschiedene Aminderivate des Flavindulins deutliche, zum Teil recht schöne Fettfärbungen (Georgievics S. 289). Die Basen des Diphenylaminderivats sowie des m Phenylendiaminderivats färben elektiv gelb; diejenigen des Nitroso-dimethylanilin- und a Naphthylaminderivats grünlichgelb-blaßgelb, diejenige des Anilinderivats graugrün elektiv (recht schön!), des Benzidinderivats gelb. Be-

sonders schön sind die Färbungen, die man mit den Toluidinderivaten bekommt (es wurde das Flavindulin mit den Toluidinen verschmolzen): die Base des o Toluidinderivats färbt grünlichblau-blaßgelblich, diejenige des p Toluidinderivats grün-blaßgelblich — also in Nuancen, für die wir sonst keine anderen künstlichen Fettfarbstoffe besitzen. Die Base des Formalinderivats färbt elektiv goldgelb. Ein durch Verschmelzen von Sprit-Indulin (G) erhaltenes Fluorindin färbt als Salz (in alkoholischer Lösung) orangerosa-graublau, als Base orangebraun elektiv.

Endlich möge hier über eine Reihe von mir hergestellter Farbstoffe berichtet werden, deren farbchemische Zugehörigkeit sich jedoch erst auf Grund exakter Analysen bestimmen ließe. Hier kommen in erster Reihe indulin- und nigrosinartige Farbstoffe, die ich durch alkalische Oxydation (mittels Antiformin in alkoholischer Lösung) von aromatischem Aminen für sich oder zusammen mit Nitro- oder Nitrosokörpern. Die meisten dieser Farbstoffe färben als Basen blaßgelb bis orangegelb, besonders hervorheben möchte ich das Oxydationsprodukt von Anilin mit o Nitrokresol: intensiv orangegelb elektiv, dasjenige von Toluidin: rotbraun-graugelblich, von  $\alpha$  Naphthylamin: gelbbraun-grau, von  $\beta$  Naphthylamin grünlichgelb-grau. Interessant sind die Oxydationsprodukte des Diphenylamins; die Base des Antiforminproduktes ist gelb und färbt Gewebe wie Fett kaum merkbar an, setzt man Salzsäure hinzu, so färbt sich das Fett in der Farbe des Farbsalzes grün, eine einzig dastehende Ausnahme in der Unzahl von Fettfärbungen, die ich vorgenommen habe. Eine direkte Fettfärbung mit dem grünen Farbsalz ist mir nicht gelungen, es resultiert nur eine graubraune Gewebsfärbung. Durch Oxydation von Diphenylamin mittels  $\alpha$  Naphthochinon erhielt ich einen Körper, dessen Base (rotbraun) in alkoholischer Lösung gelbbraun-grau, dessen Chlorhydrat (dunkelviolett, ebenfalls in alkoholischer Lösung) blaßrosaviolett elektiv färbt. Ein ähnliches Produkt erhält man bei Oxydation des Diphenylamins mittels Jodsäure. Bei Oxydation mittels Chromsäure (in alkoholischer Lösung) entsteht ein dem Antiforminprodukt völlig analoges und färberisch identisches Produkt.

Eine andere Reihe von Farbstoffen habe ich durch saure Oxydation verschiedener aromatischer Amine erhalten — sie dürften wohl den Mauveinen bzw. der Anilinschwarzgruppe zuzurechnen sein. Bei in alkoholischer Lösung durchgeföhrter Chromsäureoxydation gaben: Anilin einen Farbstoff (Benzochinon?), der blaßgelb-grau färbt, o Toluidin grellgelb-braun, p Toluidin: orangefarbt elektiv (recht schön!),  $\alpha$  Naphthylamin: bordeauxrot elektiv (recht schön!) vielleicht identisch mit Naphthylaminviolett von Piria, Georgievics S. 295?), Pheno- $\alpha$  Naphthylamin: orangegelb-graubräunlich (recht schön!),  $\beta$  Naphthylamin: orangegelb-graubraun (recht schön!), Benzidin: blaßgelblich-graubraun, Toluidin: orangegelb-graugelb (?).

Der Anilinschwarzgruppe nähert sich endlich eine Gruppe von Produkten, die ich auf diese Weise erhielt, daß Anilin bzw. o oder p Toluidin mit Hilfe von organischen oder Mineralsäuren in Wasser gelöst und durch Chromsäure oxydiert wurde; die resultierenden wasserunlöslichen Farbstoffe wurden in alkoholischer Lösung als Farbsalze und als Basen gelöst und untersucht. Alle geben mehr oder

minder schöne Farbstoffe, wobei bei Verwendung verschiedener Säuren bei demselben Amin verschiedene Farbstoffe zu resultieren scheinen. Von den Anilinderivaten gelangten zur Untersuchung: mit Essigsäure: Salz hellgrünlichgelb-gelb-braun, Base braun-grau(!); Milchsäure: Salz grellorange-schwarzbraun (!!), Base braungelb-graubraun; Weinsäure: Salz grünlichgelb-graubraun, Base orangegegelb-elektiv; Oxalsäure: grellgelb-braun (!), Base orangegegelb-graubraun; Salzsäure: Salz undeutlich, Base blaßgelblich-graugelb; Salpetersäure: Salz blaßgelblich, Base ebenso; Sulfanilsäure: Base blaßgelb. Von o Toluidinderivaten: mit Essigsäure: Salz dunkelpurpurrot, dunkelbraun (!!), Base rotbraun-blaßrosa (!!); Milchsäure: Salz bordeauxrot elektiv (!!), Base ebenso dunkler (!!); Bernsteinsäure: Salz rotbraun-graubräunlich (!!), Base rotbraun elektiv; Apfelsäure: Salz grellgelb-grauviolett (!!), Base rotbraun elektiv; Zimmtsäure: Salz blaß-rosaviolett-graubräunlich, Base rotbraun elektiv; Salizylsäure: Salz braunrot-grauviolett (!!), Base dunkelrotbraun-grauviolett (!!); Gerbsäure: Salz blaßrosa elektiv, Base undeutlich (schwer löslich); Salpetersäure: Salz grangelb licht ohne Differenzierung, Base violett elektiv (!); Phosphorsäure: Salz und Base drap-dunkelgrau (!); Jodwasserstoffsäure: Salz und Base undeutlich (sehr schwer löslich); Hippinsäure: Salz und Base rotbraun-graugelb (!); Jodsäure: Salz und Base gelbbraun-graugelb (!); Salzsäure: Salz blaßorange elektiv, Base violett elektiv (!); arsenige Säure: Salz orangerot elektiv, Base dunkelbraun elektiv (!). Von p Toluidinderivaten: Milchsäure: Salz und Base grellgelb-grauviolettblich (!); Salpetersäure: Salz blaßgelb-grau, Base grellgelb-grau (!); Salzsäure: Salz und Base grellorange-graugelb (!). Dimethylanilin-Salzsäure gab: Base blaßgelbbraun elektiv; Dipropylanilin-Milchsäure: Salz und Base orangegegelb elektiv; Dimethyl-o Toluidin-Milchsäure: Salz orangerot-violett (!), Base dunkelrotbraun-blaßrosaviolett; Diäthyl-o Toluidin-Milchsäure: Salz grellgelb-blauviolett (!), Base bordeauxrot elektiv (!); Dipropyl-o Toluidin-Milehsäure: Salz grellorange-blauviolett (!), Base blaßbordeauxrot; Diäthyl-o Toluidin-Salzsäure: Salz blaßgelblich ohne Differenzierung, Base violett elektiv (!); Diamyl-o Toluidin-Salzsäure: Salz unbestimmt, Base blaßviolettblich elektiv. Interessant ist, daß auch die nach Chromsäureeinwirkung erhaltenen Filtrate (sie enthalten das Amin in saurer Lösung) zum Teil recht schöne Doppelfärbungen, ebenso wie die Salze und Basen, geben.

Hier schließen sich weiter jene Produkte an, die aus aromatischen Aminen durch andere saure Oxydationsmittel erhalten werden. Durch Oxydation mit Jodsäure in wässriger Lösung gibt Anilin einen Körper, der in wässriger Lösung orangerosa-grau färbt, o Toluidin: feurigorangerot-graubraun (!), p Toluidin: blaßgelblich ohne Differenzierung. Mit chlorsaurem Kali und Schwefelsäure bekommt man aus Anilin einen Farbstoff, der in alkoholischer Lösung blaßgelb-graubräunlich, aus o Toluidin einen, der orangerosa elektiv, aus p Toluidin einen, der orangegegelb elektiv färbt. Mit Jodsäure gibt  $\alpha$  Naphthylamin ein Produkt, das als Salz in alkoholischer Lösung feurigrot elektiv (!), als Base rotviolett elektiv (!!) färbt; das  $\beta$  Naphthylaminprodukt färbt als Salz und Base elektiv orangegegelb, das Benzidinprodukt als Salz blaßgelb-graubräunlich, als Base gelb-grauviolettblich, das Toluidinprodukt als Salz grellgelb-graubräunlich (!), als Base orangegegelb elektiv.

Sonst wären hier noch zu erwähnen: ein nach Analogie des Paraphenylenblaus durch Einwirkung von m Phenylendiamin auf Imideazobenzol erhaltenes Metaphenylenderivat, das in alkoholischer Lösung gelbbraun färbt. Sodann wurden durch Erhitzen von Naphthylaminen in Säurelösungen gefärbte Produkte erhalten, die vielleicht als Verharzungsprodukte aufzufassen wären und in alkoholischer Lösung Fett färben: das Essigsäure- und Milchsäurederivat des  $\beta$  Naphthylamins färben elektiv gelb, das Salzsäureprodukt grellorangegegelb (!!), das Essigsäurederivat des Phenyl- $\beta$  Naphthylamins elektiv blaßorangerosa, das Salzsäurederivat des  $\alpha$  Naphthylamins elektiv orangegegelb (!). Durch alkalische Oxydation von  $\alpha$  Naphthol (mit Antiformin) wurde ein gelber Farbstoff erzielt, der in alkoholischer Lösung elektiv gelb färbt,  $\beta$  Naphthol gibt unter diesen Umständen einen roten Farbstoff mit violetter Fluoreszenz der elektiv blaßrosa färbt (Chinone oder Oxychinone?).

Schließlich seien noch zwei Körper angeführt, die direkt eine schwache Fettfärbung in alkoholischer Lösung geben. Nitrosodimethylanilin, das in der Farbstoffdarstellung viel Verwendung findet, färbt blaßgrünlichgelb-graubräunlich, ebenso, nur etwas intensiver, sein Erhitzungsprodukt, das mit dem Neugrau (Schultz - Julius 614) identisch sein dürfte.

Bevor ich mit der Besprechung der künstlichen Farbstoffe abschließe, möchte ich noch ganz kurz eine sehr interessante Beobachtung von Lorrain Smith besprechen, der ich eine Reihe von Versuchen gewidmet habe. Dieser Forscher fand nämlich, daß wenn man mit gewöhnlichen basischen Anilinfarbstoffen gefärbte fetthaltige Schnitte im sogenannten Farrantischen Medium (Lösung von Arsenik in einer Mischung von Gummi arabicum und Glyzerin) an der Luft (ohne Deckglas) aufbewahrt, nach 1 bis 2 Tagen die vorhin ungefärbten Fettkugeln langsam die Farbe aufnehmen, während das restliche Gewebe langsam sich entfärbt. Dies kann auch in der Weise geschehen, daß man den ungefärbten Schnitt in diesem Medium 1 bis 2 Tage lang an der Luft hält; setzt man nun Fuchsin, Methylenblau oder Methylviolettt hinzu, so erfolgt sofort die Färbung der Fettkugeln. Lorrain-Smith nimmt als die Ursache dieser eigenartlichen Erscheinung die Einwirkung der Luftkohlensäure an, die das Neutralfett „hydrolytisch spalten“ und aus ihm Fettsäuren freimachen soll, die der Färbung zugänglich sind. In einer reinen Sauerstoffatmosphäre sowie in  $\text{CO}_2$ -freier Luft soll die Erscheinung unterbleiben. Meine Nachprüfungen haben nun zunächst die Richtigkeit der Umfärbung dargetan, ich habe sodann gefunden, daß man das Farrantsche Medium durch eine Mischung von Gummi und Glyzerin oder durch reine Gummilösung ersetzen kann, sowie weiter, daß es genügt, den gefärbten Schnitt einfach auf Wasser schwimmen zu lassen, sofern man mit dafür sorgt, daß er nicht untertaucht. Dagegen habe ich bei Nachprüfung der Smithschen Erklärung, die überhaupt chemisch kaum wahrscheinlich ist, dieselbe nicht bestätigen können; läßt man auf einen Schnitt schwache Essig- oder Salzsäure einwirken, so kommt eine Umfärbung nicht zustande, was man nach Smith erwarten sollte. Ebensowenig gelang dies durch 12stündigen Aufenthalt in Sodawasser, wo eine Menge  $\text{CO}_2$  zur Verfügung steht. Eine eigene Erklärung für die recht interessanten Erscheinungen

vermag ich vorläufig nicht zu geben — vielleicht wäre eher an eine Umwandlung des Farbstoffes zu denken, wie wir so manche bereits früher kennen gelernt haben (Oxydationswirkungen?). Auffallend ist jedenfalls, daß die Färbung im Tone der Farbsalze zustande kommt, eine sonst beim Fett nicht beobachtete Erscheinung (mit Ausnahme der Fetteinschlüsse bei Bakterien und des Diphenylamin-Oxydationsproduktes). Doch sei dazu bemerkt, daß ich bei mit *M a n s o n*-schem Methylenblau gefärbten Schnitten beobachtet habe, daß bei Aufbewahrung im *F a r a n t*schen Medium die Fettkugeln zuerst eine rotviolette Färbung aufwiesen (also im Tone der Base), die erst dann allmählich in blau überging. Beim Fuchsin und Methylviolett, deren Basen farblos sind, würde sich diese Phase, falls vorhanden, natürlich der Beobachtung entziehen.

Außer den bisher besprochenen künstlichen Anilinfarbstoffen habe ich es versucht, eine Reihe natürlicher pflanzlicher Farbstoffe zur Fettfärbung heranzuziehen. Soweit mir bekannt, haben bisher für technische Zwecke das *Orlean* (*Extr. Bixiae Orellanae*) zur Färbung von Margarinen u. dgl. sowie das Chlorophyll zur Färbung von Pomaden Verwendung gefunden. Das *Orlean* wurde außerdem von *S o n n t a g* zur Färbung verkorkter und kutikularisierte Membranen in der Pflanzenhistologie empfohlen; dieser Autor erwähnt auch, daß Fetttropfen im Raps- und Rizinussamen damit schön gefärbt werden. Von vornherein habe ich hier alkohollösliche (am besten wasserunlösliche) Farbstoffe gewählt, da diese nach meinen sonstigen Erfahrungen die besten Aussichten auf Erfolg boten. Die Farbstoffe wurden wie die Anilinfarbstoffe meist in 70prozentigem Alkohol gelöst zur Untersuchung verwendet. Positive Resultate geben *Orlean*: goldgelb elektiv, ein Auszug aus Paprika (harzartiger Farbstoff); orangegelb elektiv, Karotin aus *Daucus Carota*: grünlichgelb-blaßgelb, ein Extrakt aus Zimmetrinde: grünlichgelb-blaßgelbbraun, Lutein (aus Eigelb): blaßgelb elektiv.

Negative Resultate hatte ich mit Extrakten aus Safran, *Sanguis Draconis*, Catechu, Ratanhawurzel, Curcuma. Sodann habe ich noch eine Reihe von Bakterienfarbstoffen verschiedenen chemischen Charakters geprüft; Pyozyanin gab ein negatives Resultat, die zur Karotingruppe gehörenden Lipochrome aus *Sarcina aurandiaca*, *Sarcina erythromyxa*, *Mycobacterium phlei*, *Saccharomyces roseus*, aus einer *Penicillium*-Art färben elektiv orangegelb bis grünlichgelb, eine schöne elektive rosaviolette Färbung geben das Prodigiosin und die ihm verwandten Farbstoffe von *Bacterium kiliense* und *Bacterium indicum*. Negatives Resultat gab ein schön purpurfarbener (auch wasserlöslicher) Farbstoff aus einem parasitischen Pilz, *Epicoccum purpurascens*, den ich der Freundlichkeit des Herrn Cand. phil. *R u p e r t* verdanke. Chlorophyll, gewöhnliches sowohl als gereinigtes, gab eine schöne Doppelfärbung: dunkelgrün-blaßgelb, besonders schön bei Nachfärbung mit verdünntem Fuchsin. Noch intensiver färbt ein mir von Herrn Prof. *L. M a r c h l e w s k i* gütigst zur Verfügung gestelltes Zink-Chlorophyll und kann diese Färbung als eine der prägnantesten für histologische Zwecke empfohlen werden. Endlich sei hier das bereits seit langer Zeit in die Technik eingeführte und vielgebrauchte Alkanin erwähnt, das recht brauchbare Färbungen liefert.

Nachdem bis jetzt das ziemlich umfangreiche Tatsachenmaterial zur Darstellung gelangt ist, wird es wohl an der Zeit sein, darauf gestützt, an die theoretische Erörterung des Fettfärbungsproblems und der darüber geäußerten Ansichten verschiedener Forscher heranzutreten. Durch die verdienstvollen Arbeiten von Michaelis, Herxheimer sowie Lorrain Smith hat einerseits die Anzahl der bekannten Fettfarbstoffe eine große Bereicherung erfahren — anderseits ist auch die theoretische Auffassung dieser Fragen dadurch beträchtlich gefördert worden. Das neue Tatsachenmaterial soll nun dazu dienen, diese Fragen einer erneuten Prüfung zu unterziehen, und auf dieser erweiterten Grundlage zu ihnen Stellung zu nehmen. Diese Fragen, die hier in Betracht kommen, lauten: 1. Welcher Natur ist der Fettfärbungsvorgang, ist er ein physikalischer oder ein chemischer? 2. Gibt es einen Zusammenhang zwischen der chemischen Konstitution eines Farbstoffs und seinem Fettfärbungsvermögen? 3. Welche Schlüsse technischer Natur ergeben sich aus der Beantwortung beider obigen Fragen?

Bezüglich der ersten Frage stimmen alle anderen darin überein, die Fettfärbung als einen rein physikalischen Lösungsvorgang zu betrachten. Die chemische Indifferenz der Neutralfette sowie die Beobachtung, daß bei den zahlreichen Färbungen und Farbsäuren oder Farbbasen, über die oben berichtet wurde, die Färbung des Fettes immer im Ton der betr. Säure oder Base, nie im Ton des Farbsalzes erfolgt, sprechen in hohem Maße für diese Anschauung. Die scheinbare Ausnahme, die die metachromatische Färbung des Fettes in wässrigen Lösungen mancher Farbsalze in dieser Hinsicht zu bilden scheint, soll weiter unten eine ausreichende Erklärung finden. Fettlöslichkeit des Farbstoffes, die demnach die Grundbedingung für das Fettfärbungsvermögen abgibt, geht nun immer mit geringer oder mangelnder Löslichkeit in Wasser, Löslichkeit in Alkohol, Chloroform, Äther, Benzol u. dergl. Lösungsmitteln einher. Es wäre aber falsch, daraus zu folgern, daß auch jeder alkohollösliche — selbst jeder nur spritlösliche wasserunlösliche, ja selbst jeder fettlösliche Farbstoff schon darum ein Fettfarbstoff sein muß. Anilinblau-Zyanin oder Safranin spritlöslich z. B. lösen sich glatt in Olivenöl, ohne deshalb noch Fett zu färben, wie wir oben gesehen haben. Es müssen folglich noch andere Faktoren

mit im Spiel sein, die über das Fettfärbungsvermögen nur entscheiden, wenn auch die oben erwähnten Löslichkeitsverhältnisse eine Grundbedingung dafür abgeben.

Zunächst muß man sich darüber klar werden, daß wenn die Fettfärbung auf einer Ausschüttelösung des Farbstoffs aus seiner Lösung durch das Fett beruht, die Lösungsaaffinitäten des Fettes einerseits, des Farbstofflösungsmittels anderseits miteinander in Konkurrenz treten — es muß also ein bestimmtes Verhältnis zwischen diesen Größen bestehen, soll der vom Fett gelöste Anteil überhaupt sichtbar werden. Es wäre also der Fall denkbar, daß das Lösungsmittel den Farbstoff so stark zurückhielte, daß das Fett kaum gefärbt oder ungefärbt erschiene — ebenso wie z. B. Bakterien durch eine konzentrierte alkoholische Fuchsinlösung kaum gefärbt werden, während dieselbe Lösung zehnfach mit Wasser verdünnt eine intensive Färbung ergibt. Hier kommt natürlich auch die absolute Löslichkeit des betr. Farbstoffs im betr. Lösungsmittel in Betracht — ein Punkt, der gerade bei den Fettfarbstoffen von großer Bedeutung ist, da an der mangelhaften Löslichkeit mancher hier in Betracht kommenden Farbstoffe die Brauchbarkeit der Färbungen scheitert.

Sodann aber muß noch ein besonders wichtiger Punkt berücksichtigt werden. Die Fettfärbung kommt ja nicht an reinem Fett zustande, sondern in einem Gewebe, dessen andere Bestandteile zum betr. Farbstoff eine physikalische oder chemische Affinität aufweisen können. Soll also ein Farbstoff Fett überhaupt färben, so müssen wir verlangen, daß abgesehen von den oben besprochenen Bedingungen die Affinitätsverhältnisse derart sind, daß ein genügender Anteil des Farbstoffs ins Fett gelangt, um ihm sichtbare Färbung zu verleihen. Soll aber der Farbstoff Fett kennbar machen, so muß er entweder es elektiv färben, d. h. unter den gegebenen Bedingungen überhaupt nicht an das restliche Gewebe herantreten, oder, ist dies der Fall, es anders färben, als das Fett. Die Rolle, welche den Affinitäten des Gewebes als Konkurrenzfaktoren im Fettfärbungsprozeß zukommt, ist bisher in der Literatur überhaupt nicht berührt worden, obwohl, wie wir sehen werden, ihr eine nicht zu unterschätzende Bedeutung für die Beurteilung unseres Problems zukommen dürfte.

Hiermit wäre aber auch bereits die zweite oben aufgestellte

Frage gestreift, nämlich jene nach der Beziehung zwischen chemischer Konstitution und Fettfärbungsvermögen eines Farbstoffs, denn es ist klar, daß diese Konstitution sowohl für die Löslichkeitsverhältnisse als auch für die Affinitäten des Farbstoffs ausschlaggebend sein muß. Das Verdienst, diese Frage zuerst aufgeworfen und einen ersten Lösungsversuch unternommen zu haben, gebührt Michaelis. Seine Erklärung bezog sich lediglich auf Sudan III, Scharlach R und einige andere von ihm studierte Azofarbstoffe. Kein Wunder, daß sie sich jetzt nicht ganz aufrechterhalten läßt, wenn auch, wie ich glaube, ein gewisser wahrer Kern in ihr steckt. Michaelis meinte, daß von den Azokörpern nur diejenigen Fettfarbstoffe sein können, welche keine salzbildende Gruppe besitzen, welche er demzufolge indifferent nennt. Ein Anhänger der Wittschen Färbungstheorie glaubt er, daß diese Konstitutionseigentümlichkeit es ist, die die Fettlöslichkeit der betr. Farbstoffe bedingt. Für die Orthooxyazofarbstoffe, die Fett färben, obzwar sie eine Hydroxylgruppe enthalten, nimmt er an, daß sie in einer tautomeren Modifikation auftreten, der salzbildende Gruppen abgehen. Dieser Auffassung hat nun Herxheimer mit Recht entgegengehalten, daß zunächst solche Orthooxyazokörper in alkoholisch-alkalischer Lösung, in der ganz sicher die Hydroxylgruppe erhalten ist, ausgezeichnete Fettfarbstoffe abgeben, sodann aber, daß Zerasin-Orangé G (Azobenzolretorzin), das zwei Hydroxylgruppen — darunter also mindestens eine nicht umlagerungsfähige — enthält, dennoch Fett färbt. Außerdem wies Herxheimer auf das Tetramethyldiamidoanthrachinon, sowie auf das Indophenol hin, die trotz ihres ausgesprochenen Basencharakters sich sehr gut zur Fettfärbung eignen. Auch meine Untersuchungen zeigen in der Azo-gruppe eine Reihe von hydroxylführenden Farbstoffen, die zum Teil sehr schöne Färbungen ergeben — darunter auch viele  $\alpha$ -Naphtholderivate, für die die Annahme von Michaelis nicht zutrifft (freilich sind nach Hantzsch sowohl Ortho- als auch Paraoxyazokörper in freier Form als Hydrazone zu betrachten, denen satzbildende Gruppen abgehen) — anderseits ausgesprochen basische Azo-fettfarbstoffe und ausgesprochen saure mit zwei Hydroxylgruppen z. B. Neuphosphin, sodann die zweifellos sauren Nitrosophenole (Chinonoxime) — in anderen Gruppen aber eine große Anzahl von Farbbasen, die zum Teil sehr eklatante Fettfärbungen liefern. In der

Folge hat nun Michaelis seinen Standpunkt dahin geändert, daß er jetzt annimmt, sowohl schwache Farbsäuren als auch schwache Farbbasen als auch indifferente Farbstoffe zur Fettfärbung befähigt sind. Die andere Behauptung von Michaelis, wonach die Konstitution der indifferenten Azokörper ihre Fettlöslichkeit und damit ihr Fettfärbungsvermögen bedinge, läßt sich auch wohl nicht aufrechterhalten angesichts der oben mitgeteilten Beobachtung, daß es sprit- und fettlösliche Farbstoffe gibt, die dennoch keine Fettfärbler sind. Das beweist wohl, daß außer den physikalischen Lösungseigentümlichkeiten auch das Verhältnis des Farbstoffs zum restlichen Gewebe mitberücksichtigt werden muß.

Wenn wir unter diesem Gesichtspunkt unter der stattlichen Farbstoffschar Umschau halten, so finden wir drei Haupttypen vertreten: den ersten bilden jene, welche das Fett elektiv färben, ohne auf das Gewebe zu reagieren. Hierher gehören manche Azo-farbstoffe und manche Farbbasen; den zweiten jene, welche sowohl Fett als auch das restliche Gewebe, beide in wechselndem Intensitätsverhältnis, mit oder ohne Differenzierung färben; den dritten endlich jene Farbstoffe, die das Fett ungefärbt lassen und nur das restliche Gewebe anfärben. Die erste Gruppe, die man die der „monotropen“ Farbstoffe im Gegensatz zu den „polytropen“ der zweiten und dritten Gruppe nennen könnte, bildete bis vor kurzem den ganzen Bestand der Fettfarbstoffe, während jetzt gerade in der zweiten Gruppe (mit gewissen Einschränkungen) die idealen Fettfarbstoffe zu suchen sind.

Diese zweite Gruppe und die Erklärung ihres Färbungsmechanismus sind es, die eine eingehendere Besprechung an dieser Stelle erheischen. Gehen wir zunächst von den metachromatischen Färbungen aus, bei denen das Fett anders gefärbt erscheint, als das restliche Gewebe z. B. von der Nilblaufärbung, die bereits Gegenstand theoretischer Erörterungen war und eine der schönsten Errungenschaften auf diesem Gebiete darstellt. Es erhebt sich hier die Frage, weshalb das Fett anders gefärbt ist und was ist es, was das Fett rot färbt? Der erste Erklärungsversuch stammt von Lorrain Smith, dem Entdecker der Nilblaufärbung, her; er meint, der rot färbende Körper sei ein Zersetzungprodukt des Nilblau, das in geringer Menge in der wässerigen Lösung entsteht, in großer Menge aber durch Verkochen einer schwach angesäuerten

Lösung erhalten wird. Dieser rote Körper ist unlöslich in Wasser, löslich in Alkohol, Äther und Xylol und kann aus der wässrigen Lösung durch Neutralfette ausgeschüttelt werden: Diese an sich richtigen Beobachtungen, werden, wie wir gleich sehen werden, am besten durch die sofort zu besprechende Theorie erklärt.

Eine andere Auffassung der Nilblau-Färbung vertritt U c k e in einem kürzlich erschienenen Aufsatz. Er meint, die metachromatische Fettfärbung ließe sich am besten durch die Theorie erklären, die Michaelis zur Erklärung der Metachromasie überhaupt aufgestellt hat. Danach soll jede Metachromasie dadurch auftreten, daß die betr. Farbstoffe beim Übergang in gewisse Media eine Umlagerung in tautomere anders als das gewöhnliche Farbsalz gefärbte Modifikationen übergehen sollen. Diese Farbstoffe — Michaelis behandelt vor allem die Chinonimidgruppe — enthalten drei Stickstoffatome, die Umlagerung der Säuregruppe vom Seiten-N zum Binde-N und damit das Freiwerden des Seiten-N bedingt die tautomere Umwandlung in ein Farbsalz, das ebenso wie die Base auf Grund der Freiheit des Seiten-N die metachromatische Färbung zeigt. Gegen diese Theorie lassen sich nun mancherlei Bedenken erheben. Wenn wir zunächst die verschiedenen in wässriger Lösung Fett metachromatisch färbenden Farbstoffe durchmustern und ihre Konstitution auf Übereinstimmung mit der Michaelischen Theorie prüfen, so finden wir, daß beim Indazin, Neumethylenblau, Naphthylenblau R (Naphtholblau), Neutralblau, Janusrot, ihre Voraussetzungen nicht zutreffen, indem beide Seiten-N hier substituiert sind. Noch weniger Übereinstimmung wird man finden, wenn man unter den verschiedenen Basen Umschau hält, die Fett metachromatisch färben; hier findet man z. B. das Capriblau, das nach Michaelis keine Metachromasie geben darf und das dennoch blaßorangerosa-blaßblau färbt oder die Basen des Tannin-Orange, Dimethyleurrhodin. Sodann ist nicht ersichtlich, warum Neutralrot und Safranin, die bereits in wässriger Lösung der Salze die von Michaelis gestellte Forderung erfüllen, dennoch Schleim, Knorpelgrundsubstanz, Kapselsubstanz der Milzbrandbazillen metachromatisch gelb färben (und zwar wiederum in der Farbe der Base), während nach Michaelis kein Umschlag erfolgen sollte (höchstens daß man wiederum eine Wanderung in entgegengesetzter Richtung annehmen würde).

Darauf, daß Methylviolett und Methylenazur sich der Theorie nicht fügen, hat übrigens schon Michaelis selber hingewiesen, wenn er auch daraus die Unzulänglichkeit der gangbaren Konstitutionsformeln der betr. Farbstoffe ableiten will, eine Anschauung, deren Legitimation erst abzuwarten ist.

Was die Anwendbarkeit der Michaelischen Theorie auf die Nilblau - Fettfärbung anbelangt, so hat eigentlich Ucke selbst das Experimentum crucis angestellt, das zu Ungunsten dieser Theorie entschieden hat. Schüttelt man Nilblausulfat in Pulver mit Öl, so sieht man, daß keine Lösung eintritt, während nach Ucke Rotfärbung des Öls eintreten müßte; diese Rotfärbung tritt erst ein, wenn man eine wässrige Lösung mit Öl ausschüttelt. Man könnte nun dem entgegenhalten, das Nilblau müßte gelöst sein, um ins Fett übergehen zu können — doch auch dann bestätigt sich die Ansicht von Ucke nicht; löst man nämlich Nilblausulfat in Alkohol und mischt mit Olivenöl, so ist die Mischung blau, aber nicht rot, wie es nach Ucke sein müßte. Dasjenige, was die Rotfärbung bedingt, ist also in der Substanz selbst und in der alkoholischen Lösung noch nicht vorhanden, entsteht erst in der wässrigen Lösung. Daß für das Zustandekommen der Färbung nicht nur die Eigenschaften des zweiten Mediums (hier des Fettes), wie nach der Michaelischen Theorie zu erwarten wäre, sondern auch diejenigen des ersten Lösungsmittels, aus dem die Lösung erfolgt, von entscheidender Bedeutung sind, zeigen folgende Experimente, die ich angestellt habe. Färbt man fetthaltige Schnitte mit Nilblau BB, aber nicht in wässriger, sondern in 70 prozentiger alkoholischer Lösung oder in Ameisensäure-Lösung, so bleibt das Fett ungefärbt, trotzdem die Lösung konzentrierter ist, als die wässrige. Ebenso läßt Nigrosin spritlöslich (m) in Ameisensäurelösung jede Fettfärbung vermissen. Auch Lösungen von Nilblau in Glyzerin oder Formalin — ebenfalls konzentrierter als die wässrigen — lassen selbst nach langer Färbung nur blasse Spuren einer Fettfärbung erkennen — was nicht der Fall sein dürfte, wenn tatsächlich erst im Fett die Umwandlung in die tautomere Modifikation erfolgen würde; wobei natürlich das erste Medium für die Metachromasie irrelevant wäre.

Dagegen glaube ich, daß sowohl diese Tatsachen als auch die Fettmetachromasie überhaupt sich viel besser und leichter mit

einer Theorie in Einklang bringen lassen, die ich in meiner Arbeit über „Die Fettfärbung bei Bakterien“ aufgestellt habe. Danach ist dasjenige, was die Rotfärbung des Fettes beim Nilblau verursacht, die Nilblaubase, die in der wässerigen Lösung durch hydrolytische Dissoziation frei wird. Es ist ja bereits bekannt, daß gerade Nilblau BB, das die schönste Fettfärbung gibt, äußerst alkaliempfindlich ist und deshalb zur Prüfung von Glassorten Verwendung findet, daß hier also die Base besonders leicht frei wird und in Aktion treten kann. Tatsächlich wird z. B. beim Nilblausulfat die Base nicht so leicht frei und muß man hier zuweilen durch Sodazusatz nachhelfen, um durch Freimachung der Base Fettfärbung zu erzielen. Anderseits machte ich neuerdings eine interessante Beobachtung bei *Gloeosporium fructigenum Berk.*, einem Schmarotzerpilz der Äpfel, den ich H. Cand. phil. Rupert verdanke; hier konnte bei vitaler Färbung mit Nilblau BB kein Fett nachgewiesen werden, wahrscheinlich wegen zu starker saurer Reaktion, erst nach Sodazusatz konnte eine große Menge großer Fettröpfchen sowohl in den Myzelien als auch in den Sporen nachgewiesen werden. (Die von Lasnier bei *Gl. Cattleya* und *Gl. Musarum* beobachteten „kugelförmigen, strahlenbrechenden, regelmäßig angeordneten Tröpfchen in großer Anzahl“ sind demnach wahrscheinlich ebenfalls Fettropfen, wofür nach meinen Beobachtungen an Bakterien auch der Umstand spricht, daß sie bei Züchtung auf zuckerhaltigen Medien entstehen). Von der synthetischen Seite der Beweisführung konnte gezeigt werden, daß alkoholische Nilblaubaselösung eine schöne orangefarbene Fettfärbung gibt, ebenso alle Basen derjenigen Farbstoffe, die in wässriger Lösung Fett metachromatisch färben.

Eine wichtige Stütze erhielt die soeben auseinandergesetzte Anschabung durch eine vor kurzem erschienene Arbeit Hanes, die eine allgemeine physikalisch-chemische Theorie der Metachromasie auf Grund der Knorpelsubstanz-Metachromasie aufstellt. Hanes kommt zur Überzeugung, daß die basischen Farbstoffe in ihren wässerigen Lösungen hydrolytisch dissoziiert sind, daß also diese Lösungen „außer den undissoziierten Farbsalzmolekülen und den ionisierten Farbsalzmolekülen zugleich Moleküle der freien hydrolytisch gebildeten Farbbase“ enthalten und daß diese Farbbase es ist, die die Metachromasie zustande bringt, indem

sie im betreffenden Medium (Schleim, Knorpel, Amyloid) sich löst. H a n s e n hat auch diese Auffassung direkt experimentell bekräftigt, indem er mittels Xylol, Benzol usw. aus den wässerigen Lösungen der metachromatischen Farbstoffe die Farbbase ausschüttete. Das ist natürlich ein sehr wichtiger Punkt, indem er zeigt, daß der metachromatische Körper bereits in der wässerigen Lösung enthalten ist, während nach der Theorie von M i c h a e l i s der Übergang in die tautomere Modifikation erst im anderen Medium (Schleim, Knorpel, Amyloid) erfolge. Nun könnte man vielleicht vom Standpunkt dieser Theorie einwenden, auch im Benzin, Chloroform, Xylol entstehe eben die tautomere Farbstoffmodifikation: doch auch diesem Einwand kann man begegnen. Ich habe nämlich gefunden, daß wenn man Nilblau BB in Substanz in Benzol oder Xylol löst (es löst sich sehr wenig davon), so entsteht eine blaue Lösung mit rotgrüner Fluoreszenz, keine rote Lösung aber, wie die M i c h a e l i s sche Theorie erwarten ließe. (Beim Stehen werden diese Lösungen violett, weil der Kontakt mit dem Reagenzglas eine Spur von Base freimacht, die der blauen Lösung ihren roten Ton beimischt.) — Der Mechanismus der metachromatischen Fettfärbung würde sich nach dieser Auffassung folgendermaßen darstellen: In der wässerigen Lösung ist eine geringe Menge freier Base enthalten, diese wird durch das Fett der Lösung entzogen (ausgeschüttelt), zur Herstellung des gestörten Gleichgewichts zwischen dissoziiertem und nicht dissoziiertem Farbsalz strebt die Lösung einer erneuten Gleichgewichtslage zu, indem sie eine gewisse (diesmal eine etwas kleinere) Menge der Base frei macht, diese wird wiederum vom Fett absorbiert usw. Je konzentrierter die Lösung, je länger die Färbungsdauer, desto intensiver wird die resultierende Fettfärbung. Auch viele andere Tatsachen finden nach dieser Theorie ihre ausreichende Erklärung; so ist es klar, daß das von L o r r a i n S m i t h beim Nilblau angenommene Zersetzungspunkt, das die Rotfärbung bedingen soll, in allen seinen Eigenschaften mit der Base übereinstimmt. Das Entstehen dieses Körpers beim Kochen einer schwach angesäuerten Lösung wird natürlich kaum als Prädilektionsmethode seiner Darstellung angesehen werden können, man wird höchstens sagen, daß selbst schwache Säurezusätze nicht imstande sind, die Dissoziation ganz zurückzudrängen (s. H a n s e n). Auch die oben mit-

geteilten Befunde, daß das Nilblau aus alkoholischer, Formalin- oder Glyzerinlösung keine oder fast keine metachromatische Fettfärbung gibt, finden ihre beste Erklärung darin, daß eben in solchen Lösungen die Dissoziation mehr oder weniger vollständig zurückgedrängt wird. Dadurch erklärt sich auch natürlich das Ergebnis des U c k e schen Versuchs mit der Lösung von Nilblau in Öl, sowie meiner Lösungsversuche in Benzol und Xylol — in der Substanz des Nilblausalzes ist nämlich keine freie Base enthalten — sie wird erst in wässriger Lösung frei. Die Bedingungen der Dissoziation, ihre Leichtigkeit und ihre Intensität variieren natürlich von Farbstoff zu Farbstoff und von Lösungsmittel zu Lösungsmittel; während beim Nilblau in 70 prozentigem Alkohol die Metachromasie versagt, ist sie sehr deutlich bei ebensolchen Lösungen der verschiedenen Sprit-Induline und Nigrosine.

Diese Auffassung erklärt weiter am besten die von Lorrain Smith beobachtete und von mir bestätigte Tatsache, daß Fettsäuren durch Nilblau blau gefärbt werden: während das Neutralfett als chemisch indifferent lediglich die Base löst auf Grund einer physikalischen Lösungsaaffinität, wird sie von den Fettsäuren zunächst absorbiert (die Lösungsaaffinitäten sind ja hier die gleichen), doch verbinden sich dann die Fettsäuren mit der Base zu blaugefärbtem fettsauren Nilblau. Dieses Verhalten ist wahrscheinlich auch die Ursache der verschiedenen Färbungen, die U c k e beim Schütteln verschiedener Öle mit wässrigen Nilblaulösungen beobachtet hat; die dunkelgrünen, violetten und blauen Färbungen sind eben Färbungen der betr. Ölsäuren z. T. in Kombination mit der Eigenfarbe des betr. Öls, z. T. aber in Kombination mit der roten Farbe des Neutralöls. Auch die blaugefärbten Tropfen, die U c k e in der Nebennierenrinde und in Leberzellen fand, dürften wohl als Fettsäuretröpfchen sich entpuppen (auch Lorrain Smith erwähnt, in seltenen Fällen in Fettlebern Fettsäuren gefunden zu haben). Einen mehr direkten Beweis für die Richtigkeit dieser Theorie und zugleich gegen diejenige von Michaelis haben spektroskopische Untersuchungen geliefert, die auf Anregung von Prof. L. Marchlewski unternommen und von ihm auch ausgeführt worden sind. Es zeigte sich nämlich, daß wenn man eine wässrige Lösung von Nilblau BB mit neutralem Olivenöl ausschüttelt, die orangerote Lösung dasselbe Spektrum zeigt, wie

die ätherische Lösung der durch Alkali freigemachten Base (breites Absorptionsband ungefähr zwischen 537—447  $\mu\mu$ . Maximum bei 492  $\mu\mu$ ), während die blaue Farbsalzlösung natürlich ein ganz abweichendes spektroskopisches Verhalten zeigt.

Jedenfalls scheint mir, daß mir die grundsätzliche Trennung der Sudan- und Scharlachfärbung von derjenigen mit Nilblau, wie sie U c k e durchführen möchte, schlecht begründet ist. U c k e vergleicht zu diesem Zweck die Diffusion des Sudans aus einer alkoholischen Lösung in Öl bei Überschichtung mit der äußerst mangelhaften des Nilblaus beim Überschichten einer wässerigen Lösung mit Öl. Der Unterschied liegt daran, daß die Konzentration der Nilblaubase in der wässerigen Lösung eine recht geringe ist im Vergleich zur Konzentration des Sudans in der alkoholischen Lösung. Hätte U c k e eine alkoholische Nilblaubasenfärbung an Stelle der wässerigen Salzlösung benutzt, so wäre wohl auch das Resultat des Versuchs ein anderes geworden. Der zweite Unterschied, den U c k e in der verschiedenen Färbung mancher ätherischer Öle findet, läßt sich, wie wir sahen, wahrscheinlich auf die Rekonstruktion des Salzes auf der Base zurückführen, doch auch hier muß zunächst die Base dank ihrer Lösungsaffinität in die Fettsäure hineindiffundieren, ebenso wie das Sudan ins Neutralfett oder die Fettsäure. Die Verbindung der Fettsäure mit der Base zum fettsauren Nilblausalz ist wohl die beste Erklärung für „irgendeine Art von Bindung“, die U c k e dabei vermutet.

Wie schon oben bemerkt wurde, ist der Dissoziationsgrad verschiedener Farbstoffe ein verschiedener; daher sieht man auch neben solchen Farbstoffen, die bereits in wässriger Lösung Fett metachromatisch färben, solche, wo man erst durch Sodazusatz eine genügende Menge der Base frei macht, um sichtbare Fettfärbung zu bekommen, weiter solche, wo ein Zusatz von Lauge dazu nötig ist, endlich solche, die nur als Basen eine Fettfärbung zustande bringen. Die Basenfärbungen bieten im allgemeinen ein gewisses farbtheoretisches Interesse; man kann darunter solche unterscheiden, wo nur elektive Fettfärbung resultiert, und solche, die Fett und Gewebe, beide meist in verschiedenen Farben, zur Darstellung bringen. Diese Metachromasie ist nun bezüglich ihres Mechanismus etwas verschieden von der Metachromasie bei wässrigen Farbsalzlösungen. Während dort tatsächlich ein Gemisch

zweier Farbstoffe — des Salzes und der Base — vorliegt, wird hier Metachromasie durch einen einheitlichen Farbstoff erzielt, indem die Base mit der Gewebssäure zu einem Farbsalz sich rekonstituiert, im Fett aber sich unverändert löst.

Hier erhebt sich nun die Frage, warum denn nicht alle Farbbasen, da sie fast alle sprit- und fettlöslich sind, Fett zu färben vermögen? So z. B. ist die Thioninbase in neutralem Olivenöl löslich, schüttelt man aber eine wässrige Thioninlösung mit solchem Öl aus, so bleibt es farblos, trotzdem die metachromatischen Thioninfärbungen die Anwesenheit der Base in diesen Lösungen uns augenscheinlich dartun. Nun gibt es wohl Farbstoffe, deren Basen ungefärbt sind, und hier wird sich eine Lösung der Base in indifferentem Fett, auch wenn sie erfolgt, dem Auge nicht kundgeben. Doch gibt es außerdem noch manche Farbstoffe, deren Basen gefärbt sind und die dennoch dem Fett gegenüber versagen — und hier kommen wir wieder auf die schon früher berührte Frage nach dem Zusammenhang zwischen chemischer Konstitution und Fettfärbungsvermögen. Wenn Michaelis diesen Zusammenhang darin erblicken wollte, daß eine gewisse Konstitution die Fettlöslichkeit der Farbstoffe und damit das Fettfärbungsvermögen bedinge, so ist das, ganz abgesehen von den speziellen Hypothesen dieses Forschers, insofern unrichtig, als, wie wir gesehen haben, Fettlöslichkeit wohl Bedingung des Fettfärbungsvermögens ist, mit ihm aber durchaus nicht immer zu koinzidieren braucht. Es gibt Farbbasen, die fettlöslich sind, ohne Fett zu färben (im Gewebe). Noch weniger kann natürlich eine Hypothese befriedigen, die Uecke freilich ohne jeden faktischen Beleg ausspricht, es sei die Naphtholgruppe, die „die Verwandtschaft zum Fett“ bedinge. Zunächst kann man sich leicht davon überzeugen, daß es naphthylführende Farbstoffe gibt, die Fett nicht färben, und Fettfärbler, denen diese Gruppe abgeht, sodann aber muß betont werden, daß ja selbst nach Ansicht von Uecke nicht von „Verwandtschaft“ (wobei man an chemische Affinität denkt), sondern nur von Lösungsaaffinität sprechen kann.

Was meine eigene Anschauung über diesen Punkt betrifft, glaube ich nur mit großem Vorbehalt mich über diese schwierige Frage äußern zu dürfen. Ich glaube, daß außer der Fettlöslichkeit noch zwei Bedingungen von den Farbstoffen erfüllt werden müssen,

wenn sie Fett färben sollen; sie müssen direkt (die schwach sauren resp. „indifferenten“ Farbstoffe) oder als Basen genügend gefärbt sein, um ihre Färbung dem Fett mitteilen zu können. Zweitens aber müssen die Affinitätsverhältnisse zum Gewebe einerseits (physikalische und chemische), zum Fett (physikalische) anderseits so beschaffen sein, daß die ersten mindestens einen solchen Anteil des Farbstoffes freilassen, daß das Fett damit sichtbar gefärbt werden kann. Hier glaube ich, liegt die wahre Bedeutung der von Michaelis geforderten „Indifferenz“ der Farbstoffe, die Fett färben sollen, nicht aber darin, daß sie Fettlöslichkeit bedinge, wie Michaelis gemeint hat. Freilich ist die Indifferenz weder so absolut zu verstehen, wie Michaelis es anfangs verlangt hat, d. h. als Abwesenheit von salzbildenden Gruppen, noch auch so, wie er später auf Grund der Herxheimer Kritik es formuliert hat, daß nur indifference, schwach saure oder schwach basische Farbstoffe Fettfärbser sein können — sie ist eben ein ganz relativer Begriff, der als Ausdruck der Affinitätsverhältnisse des betr. Farbstoffs aufzufassen ist. Ein Beispiel wirklicher, absoluter Indifferenz bietet Chinolingelb spritlöslich (Chinophthalon), ein Chromogen ohne auxochrome und salzbildende Gruppen; es zeigt, daß gefärbte Körper, die stricto sensu keine Farbstoffe sind, Fett färben können, weil es sich dabei nur um einen Lösungsvorgang handelt. Hieran reihen sich, sofern man die Hydrazonformel für manche Azofarbstoffe gelten läßt, die „indifferenten“ Fettfarbstoffe, sowie die praktisch indifferenten wie Indophenol, weiter aber kommen mit allmählichen Übergängen „differenten“ Farbstoffe von deutlichem chemischen Charakter und zwar schwach saure sowie schwach oder stärker basische. Die „relative Indifferenz“ als Charakter dieser Fettfarbstoffe zeigt sich darin, daß diejenigen Gruppen, in denen wir die meisten Fettfarbstoffe finden, tatsächlich schwach ausgeprägten chemischen Charakter zeigen — Indophenole, Oxazine, Mauveine. Auch in den einzelnen Gruppen lassen sich viele Beispiele anführen, die dafür zu sprechen scheinen: wird durch Anhäufung von Hydroxylen bzw. Karboxylen der Farbstoff ausgesprochen sauer, so sieht man zunächst, daß die Färbung den differentiellen Charakter verliert, indem Fett und Gewebe sich gleichmäßig färben, sodann aber bei noch stärkerem Säurecharakter vermißt man jede Fettfärbung überhaupt. Die Einführung auch

nur einer Sulfogruppe genügt, um das Fettfärbungsvermögen verschwinden zu lassen: wieweit dabei die gesteigerte Wasserlöslichkeit bzw. verminderte Fettlöslichkeit und wieweit der Säurecharakter in Betracht kommen, läßt sich nicht entscheiden. In der Triphenylmethangruppe sehen wir, daß die Rosaniline und Para-rosaniline sowie ihre Methylderivate inaktiv sind — erst die Phenyl- bzw. Phenylnaphthyllderivate färben Fett als Basen. Nun sind mit der Einführung dieser Gruppen zwei Änderungen verbunden: zunächst eine Verdunkelung der Farbe zu Blau — und damit wird auch die Base, die bei den roten, grünen und violetten Farbstoffen dieser Gruppe farblos ist, gefärbt. Anderseits aber bedingt die Einführung dieser Gruppen eine Herabsetzung der Basizität, so daß das Anilinblau chemisch fast indifferent ist. Hier können also beide Faktoren dafür verantwortlich gemacht werden, daß gerade diese Derivate unter den Rosanilinabkömmlingen Fettfärbser sind. Vielleicht ist auch in anderen Farbstoffgruppen der Einfluß der eingeführten Phenyl- bzw. Naphthylgruppen in dieser Hinsicht nicht ohne Bedeutung (Induline, Mauveine). Eine hierher gehörige Beobachtung kann man auch der Gruppe der Oxazone entnehmen: diese sauren Farbstoffe, obzwar nächste Verwandte der guten Fettfärbser Oxazine färben kein Fett, wohl aber, wenn man in sie den basischen Anilin- oder Toluidinrest einführt (Gallozyanin, Zölestinstinblau, Prune). In entgegengesetztem Sinn d. h. durch Herabsetzung der Basizität ebenso wie die Substitution von Phenylen oder Naphthylen wirkt wahrscheinlich die Behandlung der Farbstoffe mit Chlor, Brom, Formalin, diversen Oxydationsmitteln, die, wie wir an zahlreichen Beispielen gesehen haben, manche nicht fettfärbende Farbstoffe zu Fettfärbern umwandelt. Das dürfte speziell für die Rosaniline und die ausgesprochen basischen Thiazine zutreffen. Natürlich ist diese relative Indifferenz der Farbstoffe auch insofern von Bedeutung, als gerade solche Farbstoffe von schwach ausgesprochenem chemischen Charakter am leichtesten hydrolytisch gespalten werden und daher am meisten zur Metachromasie neigen. Dabei wäre noch zu berücksichtigen, daß wir bisher summarisch das Gewebe als feststehende Größe betrachtet haben, während für die Histologie und Histopathologie eine Reihe von verschiedenen Geweben mit verschiedenen zum Teil wechselnden Eigenschaften in Betracht kommen, was die Frage natürlich noch

komplizierter erscheinen läßt. Es wäre also denkbar, daß ein Farbstoff Neutralfett in einem Organ färben würde, in einem anderen aber versagte, weil die Affinitäten des letzteren für den Farbstoff andere sind, als beim ersten.

Auf diesen Umstand muß man, wie ich glaube, wohl zum größten Teil die recht beträchtlichen Unterschiede zurückführen, die die Fettfärbung bei den Bakterien und in tierischen Geweben aufweist. Die ausgesprochen basophilen Eigenschaften des Bakterienplasmas, vielleicht auch eine andere physikalisch-chemische Struktur, das Vorhandensein eines Ektoplasmas bzw. seiner Differenzierungsprodukte, die der Fettfarbstoff durchdringen muß, wenn er zu den Fettkugeln gelangen will (während er im Schnitt dazu freien Zutritt hat) — das sind Momente, die es gerechtfertigt erscheinen lassen, daß manche typischen „Fettreaktionen“ hier versagen (Osmium, Sudan, Scharlach u. dergl. zweifelhaft), anderseits aber hier eine stattliche Reihe von Beizenfärbungen möglich ist, die bei tierischen Geweben im Stich lassen. Diese Beizenfärbungen weisen auf einen Färbungsmechanismus hin, den wir in der Fettfärbung beim Tier vermissen, auf die Möglichkeit der Fettfärbung mit „neutralen“ (nicht indifferenten!) Farbstoffen (die pikrinsauren Farbbasenverbindungen). Fettfärbungsversuche bei Pflanzen, die ich aus äußeren Gründen bis jetzt erst in geringem Umfang habe ausführen können, die ich aber weiter forzusetzen gedenke, werden wahrscheinlich in noch höherem Maße dartun, welche Bedeutung der physikalischen und chemischen Struktur des umgebenden Gewebes bei der Fettfärbung zukommt. Ob vielleicht auch chemische Differenzen in der Konstitution der Fetttropfen hier mit im Spiel sind, müßten erst spezielle Untersuchungen lehren.

Ein anderer nicht zu vernachlässigender Faktor, der in der Technik der Fettfärbung eine große Rolle spielt, ist das Lösungsmittel, in dem der Fettfarbstoff zur Wirkung gelangt. Bezuglich der in wässriger Lösung metachromatisch färbenden Farbstoffe wurde bereits oben darauf hingewiesen, daß manche sehr gute Lösungsmittel der Metachromasie hinderlich sein können durch Unterdrückung der Dissoziation. Bezuglich der spritlöslichen Farbstoffe und Farbbasen ist folgendes zu bemerken: die geringe Löslichkeit dieser Farbstoffe ist ein Hindernis, das sich einer inten-

siven Färbung entgegenstellt, anderseits aber darf absoluter Alkohol wegen seines Fettlösungsvermögens nicht als Lösungsmittel verwendet werden. Bei phenolartigen Farbstoffen kann Alkalizusatz zum 70 prozentigen Alkohol sein Lösungsvermögen beträchtlich erhöhen (Herxheimer), ebenso wurden Mischungen von 70 prozentigem Alkohol mit Azeton empfohlen. Daß phenolartige Azofarbstoffe in alkalischer Lösung Fett nicht färben, wie Herxheimer bezüglich des Zerasin-Orange G festgestellt hat, dürfte wohl auf Bildung von Salzen zurückzuführen sein, die weder vom Gewebe, noch vom Fett zerlegt werden können. Es geht jedoch Herxheimer unbedingt zu weit, wenn er daraus schließt: „ein Diffundieren aus alkoholischer Lösung in das Gewebe ist offenbar Vorbedingung für die histologische Fettfärbung.“ Das gilt nicht nur von den neuentdeckten wässrigen Fettfarbstoffen, sondern auch von den klassischen Fettfärbern Sudan III, Scharlach R, Indophenol, Alkannin u. dergl. Diese Farbstoffe färben nämlich, wie ich habe feststellen können, das Fett aus verschiedenartigsten Lösungen, die keinen Tropfen Alkohol enthalten; Vorbedingung ist dabei nur, daß der betr. Farbstoff im betr. Lösungsmittel sich löst. Für histologische Zwecke wird man natürlich mehr verlangen müssen, und zwar daß das Lösungsmittel des Farbstoffs das Fett nicht löst, und zweitens, daß es das so restliche Gewebe, falls auch seine Darstellung erwünscht ist, nicht merklich alteriert, eine Forderung, die allerdings nur wenige Lösungsmittel erfüllen dürften. Heißgesättigte Lösungen von Sudan III, Sudan IV oder Scharlach R in Formalin haben ungefähr die Konzentration der Lösungen in 70 prozentigem Alkohol und geben ganz gute Färbungen; besonders schön ist die Färbung beim Indophenol, das sich in Formalin sehr gut löst. Ebenso gelingt es, Fettfärbungen mit Hilfe von Farbstofflösungen in konzentrierten Säuren zu erzielen: Indophenol scheidet hier aus, weil es entsprechend seinem Gruppencharakter von Säuren zersetzt wird. Sudan III gibt in konzentrierter Salzsäure eine schwache Lösung, die blaßorange färbt. In konzentrierter Salpetersäure löst sich das Sudan III (wie es scheint unter teilweiser Umwandlung) recht gut, in dieser Lösung färbt sich das Gewebe gelb (Xanthoprotein), das Fett orangerot. In konzentrierter Schwefelsäure gibt Sudan III eine dunkel-violette Lösung, die das gequollene Gewebe rot färbt (teilweise Bildung von Sulfoderivaten?); das Fett

bleibt farblos. In 50 prozentiger Schwefelsäure (violette Lösung) färbt es orangerot-gelbbräunlich (Sulfoderivate?). In konzentrierter Jodwasserstoffsäure bekommt man eine mäßig konzentrierte Sudanlösung; der Färbungseffekt ist schwer zu beurteilen infolge der diffusen Jodfärbung des Gewebes. In konzentrierter Phosphorsäure ist die Lösung violett, sie gibt eine orangefarbene schwierige zu differenzierende Färbung (oder Farbniederschlag beim Übertragen des Schnittes in Wasser?). Eine recht konzentrierte und sehr schön und intensiv färbende Lösung von Sudan III erhält man bei Verwendung einer Mischung von 7 Teilen Alc. absol. und 3 Teilen Phosphorsäure — sie ist ungefähr doppelt so stark, als die Lösung in 70 prozentigem Alkohol ohne Säure; die Intensität der Färbung entspricht dabei derjenigen, die man gewöhnlich mit Scharlach R bekommt, oder übertrifft sie noch sogar. Noch stärker färbt eine Lösung in einer Mischung von Phosphorsäure und Alkohol zu gleichen Teilen; die Lösung ist fast schwarzrot. Die Färbung erfolgt sehr schnell, eine Kontrastfärbung ist bei solchen Schnitten nur mit sauren Farbstoffen zu erzielen — mit basischen bekommt man infolge der Säureimprägnation sehr schwache und unechte Nachfärbung. In 50 prozentiger wässriger Phosphorsäure bekommt man eine blaßrosa Lösung, die sehr schwach färbt, in 25 prozentiger ist Sudan III unlöslich. In Eisessig erhält man ziemlich konzentrierte Sudanlösungen (etwa doppelt so stark als in 70 prozentigem Alkohol); es färbt sich darin das Gewebe diffus blaß-bräunlichrot, speziell um die Fetttropfen herum, die selber ungefärbt erscheinen: eine genauere Analyse ergibt, daß das Fett tatsächlich gelöst worden ist und zum Teil in die Farbstofflösung zum Teil in das umgebende Gewebe hineindiffundiert hat, daher die scheinbar paradoxe Erscheinung. In Milchsäure gibt Sudan III eine recht konzentrierte Lösung (etwa 3 mal so stark als in 70 prozentigem Alkohol), die intensiv rot färbt; geradezu glänzend ist das Färbungsresultat in einer Ameisensäurelösung, die etwa 6 mal konzentrierter ist, als diejenige in 70 prozentigem Alkohol. In diversen Fettlösungsmittern bekommt man meist mittelstark bis stark konzentrierte Lösungen von Sudan III; die Färbungseffekte sind verschieden, je nach der Färbungsdauer und der Intensität des Fettlösungsvermögens; die Fettkügelchen färben sich intensiv rot, sofern sie nicht herausgelöst werden, zumeist wird das Gewebe mehr oder weniger

stark diffus mitgefärbt, weil das gelöste Fett in dasselbe hineinfundiert. Ein solches Verhalten zeigen Lösungen von Sudan im flüssiger Karbolsäure, o Kresol, Tuluol, Xylool, Anilin, o Toluidin, Phenylhydrazin, Azeton, Amylalkohol, Chloroform, Äther, Benzol, Benzaldehyd, Xylenol 1 : 3 : 4. Verwendbar sind dagegen Lösungen in Chlorpikrin (mittelstark), Phenylazetat (mittelstark), Salicylaldehyd (stark), flüssigem Paraffin (stark), die beiden letzteren geben sehr intensive Färbungen. Manche der obengenannten fettlösenden Medien, die als solche wegen des Herauslösens der Fettkugeln nicht direkt verwendbar sind, kann man aber als Zusätze zu Alkohol verwenden, um seine Lösungsfähigkeit für Sudan zu erhöhen. Sehr gut verwendbar ist z. B. eine Mischung aus: Alkohol 70, Phenol 10, Wasser 20; über 12—15% darf man mit dem Phenolzusatz nicht steigen. Bei solchem Phenolgehalt kann man mit der Alkoholkonzentration bis 20—10% herabgehen und bekommt noch immer gut färbende Lösungen.

Es erhebt sich nunmehr eine für die Beurteilung der Fettfärbungen sehr bedeutungsvolle Frage, nämlich inwiefern die einzelnen oben besprochenen Färbungsmethoden für das Fett charakteristisch, also inwiefern sie als elektive mikrochemische Reaktionen zu betrachten sind. Nach den auseinandergesetzten Anschaauungen über den Mechanismus der Fettfärbung kann natürlich bei einem Lösungsvorgang von einer mikrochemischen Reaktion sensu stricto nicht die Rede sein. Trotzdem können wohl die Färbungen, falls sie elektiv sind, die Dignität solcher Reaktionen beanspruchen — oder aber, sofern dies nicht ganz der Fall ist, als Demonstrationsfärbungen Gebrauch finden. Nun wissen wir freilich von den metachromatischen Färbungen, daß es eine Reihe verschiedener Substrate gibt, die Metachromasie aufweisen, so Amyloid, Knorpel, Schleim, Mastzellengranula, Kapselsubstanz bei Bakterien, um nur die wichtigsten zu nennen, und es erhebt sich nun die Frage, ob das ebenfalls metachromatisch sich färbende Fett von jenen Substanzen auf färberischem Wege sich wird unterscheiden lassen. Hierzu ist zu bemerken, daß wohl keine absolute, aber eine relative Elektivität sich nachweisen läßt: sie beruht darauf, daß das Zustandekommen der Metachromasie von dem Affinitätsverhältnis eines bestimmten Farbstoffs zum „chromotropen“ Medium einerseits, zum restlichen Gewebe anderseits be-

dingt ist. Daher kommt es, daß ein und derselbe Farbstoff nicht alle „chromotropen“ Substrate metachromatisch färben muß, und daß ein und dasselbe Substrat von manchen „metachromatischen“ Farbstoffen metachromatisch gefärbt wird, von anderen aber nicht. So z. B. sehen wir, daß das Fett wohl von Oxazinen rot gefärbt wird, ebenso wie Schleim, Knorpel, Mastzellengranula und Milzbrandbazillenkapseln (nach eigenen Feststellungen), nicht dagegen von Thiazinen, Safranin, Neutralrot und Methylviolett, die jene Substrate metachromatisch färben. Umgekehrt gibt es Farbstoffe, die Fett metachromatisch färben, dagegen beim Amyloid versagen (Oxazine, Chrysoidin); Amyloid verhält sich überhaupt, etwas abweichend von den andern „chromotropen“ Substraten, indem bei manchen Thiazinen und Oxazinen nicht nur nicht die Farbe der Base hervortritt, sondern eine mehr grünblaue Färbung resultiert, die den sauren Lösungen dieser Farbstoffe (durch Zurückdrängen der Dissoziation) eigen ist. So verhalten sich die Färbungen mit Methylenblau (auch mit der Mansonischen Lösung), Thionin, Toluidinblau, Nilblau A und Nilblau BB, Brillantkresylblau, Nigrosin spritlöslich. Für die praktische differenzielle Färbung wird es daher nötig sein, das Verhalten der verschiedenen Fett metachromatisch färbenden Farbstoffe gegenüber den anderen „chromotropen“ Substraten eingehend zu studieren, worauf sich dann eine Differenzierung des Fettes von diesen durch vergleichende zwei oder drei Färbungen wird feststellen lassen. Finde ich z. B. ein mit Nilblau rot sich färbendes Gebilde und färbt es sich mit Thionin ebenfalls rot, so ist es kein Fett. Anderseits wird es wohl von Interesse sein, manche der das Fett metachromatisch färbenden Farbstoffe in die Färbung der anderen Substrate einzuführen bzw. sie für eine differenzierte Trennung dieser Substrate untereinander zu verwenden. Was die Gruppe der sogen. „indifferenten“ Farbstoffe betrifft, so ist hier die Elektivität eine ausgesprochenere, zum Teil wegen ihrer Indifferenz; freilich wären hier noch eingehendere Untersuchungen eventl. unter Verwendung der anderen oben angeführten Lösungsmittel erwünscht.

Anderseits wieder ist die diagnostische Verwendbarkeit der Fettfärbungen davon bedingt, ob dieselben tatsächlich jedes Fett zur Darstellung bringen. Für das Neutralfett sowie für Fettsäuren und Lipochrome scheint das festzustehen, fraglich ist nur das Ver-

halten der Fettfärbungen zu den verschiedenen Lipoiden. Von Sudan III wird das Myelin schwach rosa gefärbt, neuerdings werden nach U c k e Thionin sowie Kresylviolett zum Studium von Degenerationsvorgängen im Zentralnervensystem verwendet. Noch wichtiger wären wohl Methoden, die es erlauben würden, die mit Eiweißsubstanzen verbundenen Lipoide, die einen wichtigen Bestandteil tierischer und pflanzlicher Zellen zu bilden scheinen, differenziell darzustellen. Angesichts der großen Bedeutung, die den Lipoiden nach neuesten Untersuchungen in der Zellphysiologie und Pathologie sowie in der Immunitätslehre zukommt, wären hier weitere Untersuchungen wohl am Platz. Nach den klassischen Untersuchungen von O v e r t o n scheinen die mit Wasser imprägnierten und mit Eiweiß verbundenen Lipoide eine geringere Färbungselektivität aufzuweisen, als die reinen Lipoide bzw. Neutralfette, indem sie sich mit allen basischen Farbsalzen tingieren. Bemerkenswert ist jedenfalls die Übereinstimmung, die sich darin zeigt, daß sowohl zur Fettfärbung als auch zu Vitalfärbungen des Protoplasmas saure Sulfofarbstoffe sich nicht eignen, was wohl auf ihre exquisite Wasserlöslichkeit bzw. Lipoidunlöslichkeit zurückzuführen ist.

Für die histologische Praxis ergeben die obigen Untersuchungen eine große Auswahl verschiedenartiger Farbstoffe, sowohl elektiver als metachromatischer; im allgemeinen bewegt sich die Nuance der meisten zwischen gelb, rot und braun; von violetten, blauen und grünen haben wir nur vereinzelte kennen gelernt. Jedenfalls bieten die besprochenen Farbstoffe die Möglichkeit, verschiedenste Farbenkombinationen herzustellen; eine weitere Vervollkommenung in dieser Richtung können Versuche mit Farbstoffgemischen bringen, wie ich sie bereits in Angriff genommen habe; man wird auf diese Weise auch Nuancen erzielen können, für die wir keinen geeigneten Farbstoff besitzen. Ein Gemisch von Indophenol und Sudan III in Alkohol oder Formalin gibt eine recht intensive, schwarzbraune Fettfärbung. Die erwünschte Intensität der Färbungen wird man durch Verwendung mancher oben besprochenen Lösungsmittel oder Zusätze (Formalin, Phenol, Phosphorsäure, Ameisensäure, Paraffinum liqu.) und dadurch erhöhte Konzentration der Farbstofflösungen zu erreichen suchen. Die Lösungen werden am zweckmäßigsten heiß gesättigt und nach eventueller Filtration frisch

gebraucht, da mit der Zeit immer ein Teil des Farbstoffs aus der Lösung fällt.

### Zusammenfassung der Ergebnisse.

1. Jede Fettfärbung ist ein physikalischer Lösungsvorgang, wobei der Farbstoff aus seinem Lösungsmittel vom Fett herausgezogen wird.

2. Maßgebend für den Färbungseffekt ist das Verhältnis der Affinitätsgrößen des Farbstoffs zu den drei konkurrierenden Lösungsmedien: Fett, Gewebe und Lösungsmittel.

3. Der Farbstoff muß also fettlöslich sein, und es darf seine Lösungsaffinität zum Lösungsmittel bzw. Lösungs- und chemische Affinität zum Gewebe nicht so groß sein, daß sie den Farbstoff am Hineindiffundieren ins Fett hindern.

4. Fettfarbstoffe sind dementsprechend entweder indifferenten, fettlösliche Farbstoffe oder aber relativ ganz schwache Farbsäuren und mehr oder weniger schwache Farbbasen.

5. Die indifferenten Farbstoffe (manche Azokörper, Indophenole) färben dank der Indifferenz elektiv aus alkoholischen Lösungen, ebenso die Farbsäuren.

6. Die nur relativ indifferenten Farbbasen färben entweder aus den wässerigen Lösungen ihrer Farbsalze (Nilblau, Naphtholblau, Neuechtblau, Neumethylenblau, Brillantkresylblau, Kresylechtviolett, Indazin, Echtneutralviolett, Neutralblau, Rosolan, Chrysoidin, Janusrot, Janusblau, Janusgrün, Bismarckbraun) oder aus den alkoholischen Lösungen ihrer Salze (Induline, Nigrosine) oder aus den alkoholischen Farbbasenlösungen (viele andere Basen).

7. Die Metachromasie des Fettes bei Färbung mit wässerigen Farbsalzlösungen beruht darauf, daß die durch hydrolytische Dissoziation darin freiwerdende Base von dem Fett gespeichert wird, während das Gewebe im Tone des Farbsalzes sich anfärbt.

8. Dadurch erklärt sich das Fehlen der Metachromasie bei Färbung mit solchen Lösungen, in denen das Lösungsmittel (Alkohol, Glyzerin, Formalin, Säuren) die Dissoziation zurückdrängt.

9. Wo die Dissoziation des Farbsalzes ungenügend ist, muß man, um Fettfärbung zu erzielen, den in der wässerigen Lösung gefärbten Schnitt mit Alkalien behandeln oder aber mit der Basenlösung färben.

10. Die Elektivität der metachromatischen Fettfarbstoffe ist relativ; ein für Fett metachromatischer Farbstoff muß nicht auch alle anderen chromotropen Substrate ebenso färben und umgekehrt.

11. Durch den Einfluß der Affinität des Gewebes zum Farbstoff erklären sich die verschiedenen Resultate, die dieselben Färbungsmethoden bei tierischen und pflanzlichen Geweben bzw. bei Bakterien zutage bringen.

12. Auch bei den indifferenten Fettfarbstoffen kann die Färbung nicht nur aus alkoholischen, sondern auch aus verschiedenen anderen Lösungsmitteln erfolgen (Säuren, Phenole, flüssiges Paraffin, Formalin usw.); manche davon ermöglichen durch ihr hohes Lösungsvermögen das Erzielen von konzentrierten Lösungen bzw. intensiven Fettfärbungen (als Lösungsmittel oder als Zusätze zu Alkohol).

13. Es können auch indifferente Chromogene, ohne selbst Farbstoffe zu sein, Fett physikalisch anfärben.

14. Auch manche organischen Farbstoffe (Chlorophyll, Prodigiosin, Lipochrome) eignen sich zur Fettfärbung.

Krakau, den 15. April 1909.

### L iteratur.

- Eisenberg, Ph., Über Fetteinschlüsse bei Bakterien. Ztbl. f. Bakter. I. Abt. Orig. XLVIII, H. 3, S. 257 bis 274. — Derselbe, Zur Frage der Nilblau-Fettfärbung. St. Petersburger med. Wschr. 1909, Nr. 8. — von Georgievics, G., Lehrbuch der Farbenchemie. III. Aufl. Leipzig-Wien 1907. — Herxheimer, G., Über Fettfarbstoffe. D. med. Wschr. 1901, Nr. 36, S. 607 bis 609. — Lasnier, E., Recherches biologiques sur deux Glocosporium. Bull. de la Soc. mycolog. de France 1908. Ref. in Ztbl. f. Bakteriolog. II. Abt. XXII, Nr. 4/6, S. 151. — Lorrain Smith, J., Abstract of a paper on „The Staining of Fat with Aniline Dyes“ read at the Inaugural Meeting of the Pathological Society of Great Britain and Ireland. July 14 th. 1906. — Derselbe, Abstract of a paper on „Further observations on the Staining of Fat with Aniline Dyes“ read at the Meeting of the Pathological Society of Great Britain and Ireland. January 12 th. 1907. — Michaelis, L., Über Fett-Farbstoffe. Virch. Arch. CLXIV, S. 263 bis 270. — Derselbe, Artikel „Fett“ und „Metachromasie“ in der Enzyklopädie der mikroskopischen Technik 1903, Bd. I S. 363 bis 371, Bd. II, S. 797 bis 803. — Nietzki, R., Chemie der organischen Farbstoffe. IV. Aufl. Berlin 1901. — Overton, zit. in Höbers Physikalischer Chemie der Zelle und der Gewebe. 2. Aufl. 1906, S. 172 bis 174. — Pappenheim, A., Grundriß der Farbchemie. Berlin 1901. — Schmirl, G., Die pathologisch-histologischen Untersuchungsmethoden. IV. Aufl. Leipzig 1907. — Schultz, G., und Julius, P., Tabellarische Übersicht der künstlichen organischen Farbstoffe. IV. Aufl. Berlin 1902. — Sonntag, P., Das Orlean, ein neues Mittel zur Färbung der ver-

korkten und kutikularisierten Membran. Zschr. f. wiss. Mikroskopie, XXIV, 1907, H. 1, S. 21 bis 25. — U c k e , A., Über Fettfärbung. St. Petersburg. med. Wschr. 1908, Nr. 52, S. 729 bis 731. — H a n s e n , C. C., Über die Ursachen der metachromatischen Färbung bei gewissen basischen Farbstoffen. I. Teil. Ztschr. f. wiss. Mikroskopie XXV, 1908, H. 2, S. 145 bis 154. — Eisenberg, Ph., Weitere Untersuchungen über Fetteinschlüsse bei Bakterien, Ztbl. f. Bakter. I. Abt., Orig. II, H. 2, S. 115 bis 121.

---

## XVII.

### Ein Beitrag zur Kenntnis der Infundibularzysten des menschlichen Gehirnes.

(Aus dem Pathologischen Institut der Universität Göttingen und dem Patholog.-Hygien. Institut der Stadt Chemnitz.)

Von

Prosektor Dr. Heinrich W. E. Ehlers, Rixdorf,  
früherem Assistenten beider Institute.

(Hierzu 6 Textfiguren.)

---

Unter den Zysten, die sich bei der Sektion im Gehirn vorfinden, können wir zwei große Gruppen unterscheiden. Das eine Mal handelt es sich um Zysten im allgemeinen Sinne, die auf irgendwelche pathologischen Prozesse in der Hirnsubstanz zurückzuführen sind. Das andere Mal finden wir echte Zysten im anatomischen Sinne, d. h. Hohlräume, die eine epitheliale oder endotheliale Innenauskleidung aufzuweisen haben und die wohl fast ausschließlich in dem Gebiete der Tumoren zu suchen sind. Mit diesen letzteren wollen wir uns hier näher befassen.

B o s t r o e m hat das große Verdienst, in dem Streite um den histologischen Charakter des meningealen Cholesteatoms Klarheit geschaffen zu haben. Er betrachtet die Cholesteatome des Gehirns „als typische epidermoidale Bildungen, die auf einer embryonalen Verlagerung reiner Epidermis, d. h. frei von anderen Attributen der Haut beruhen müssen, und schlägt für sie die Bezeichnung Epidermoid vor“. Diese Auffassung ist dann im Laufe der Jahre wohl ziemlich allgemein akzeptiert worden. Wenigstens haben sich die meisten der Autoren, die sich nach ihm mit dem Cholesteatom befaßt haben, auf seinen Standpunkt gestellt.