

(Aus dem Tropeninstitut zu Moskau [Direktor: Prof. E. Marzinowski].)

## Zur Theorie der Azureosinfärbung\*).

Von

**Seh. Moschkowski,**  
Assistenten des Instituts.

(Eingegangen am 4. Mai 1923.)

### Inhaltsübersicht.

- I. Einleitung (S. 1).
- II. Die Rolle des Eosins (S. 3).
- III. Die Rolle des Azurs (S. 4).
  1. Chemisches über Thiazinfarbstoffe (S. 4).
  2. Die Metachromasie und der Romanowsky-Effekt (S. 6).
  3. Das Wesen der Metachromasie (S. 7).
  4. Die Färbung mittels Lösungen der Azurfarbstoffe (S. 8).
  5. Die Strukturformeln der Chromoisomere der Azurfarbstoffe (S. 9).
  6. Das Wesen des Färbungsprozesses (S. 11).
  7. Die Beizenzrolle des rötlichen Tautomers (S. 11).
- IV. Der Mechanismus der Azureosinfärbung (S. 12).
  1. Bildung eines komplexen Salzes (S. 12).
  2. Kolloidale Hülle (S. 13).
  3. Der Romanowsky-Semieffekt (S. 13).
- V. Theoretisches über die Präparation von Methylenblaulösungen für Romanowsky-Färbung (S. 13).
- VI. Einige Bedingungen der Romanowsky-Färbung (S. 15).
- VII. Die Darstellung der azurophilen Substanzen mittels anderer Farbstofflösungen (S. 17).
- VIII. Die Stellung der vorgebrachten Theorie im Rahmen der bisher bekannten Theorien (S. 18).
- IX. Zusammenfassung (S. 19).

### I. Einleitung.

Als ich vor 2 Jahren das Studium des Wesens der *Romanowsky*-Färbung begann, konnte ich einen bunten Strauß verschiedenartiger und entgegengesetzter Anschauungen und Theorien aus der Literatur sammeln: von *Pappenheims* Theorie der physikalischen Bindung — starre Lösung — der „Carbinolbase“ der (angeblichen) Sulfonverbindung<sup>50)</sup> bis zu den rein chemischen Theorien.

\*) Nach einem Vortrage in der Moskauer Abteilung der Russischen Pathologen-Gesellschaft am 8. XII. 1922. Zum ersten Male sind die vorgetragenen Anschauungen am 24. I. 1922 in einem Vortrage im Tropeninstitut zu Moskau entwickelt worden. Siehe auch <sup>39, 40).</sup>

Schon der Überfluß an Theorien ließ klar erkennen, daß es keine die entsprechenden Erscheinungen vollständig erklärende gab. Die Äußerungen der Autoren, die sich mit dem Problem der *Romanowsky*-Färbung eingehend befaßt haben, klingen folgendermaßen:

„The complete theory of the *Romanowsky* effect does not yet exist“ [Scott<sup>60</sup>].

„Im übrigen halte ich heute noch das Wesen des *Romanowsky*-Effekts für völlig rätselhaft“ [Michaelis<sup>36</sup>].

„Wie über das Wesen der Färbung überhaupt, sind wir über den letzten Grund der Eosinazurfärbung bis jetzt im unklaren“ [Prowazek<sup>54</sup>].

Die Arbeit von *Baudisch* und *Unna* „Thiazinrot“<sup>63</sup>), dann *Unnas* Vortrag in der biologischen Abteilung des ärztlichen Vereins Hamburg<sup>64, 65</sup>), haben für das Problem der Azureosinfärbung von neuem das Interesse erweckt.

*Romanowsky*<sup>57</sup>) gelang es, mittels eines Gemisches von Methylenblau- und Eosinlösungen, in den Malariaplasmodien eine spezifisch färbbare Substanz zum Vorschein zu bringen, die später als die Kernsubstanz der Plasmodien erkannt wurde. Dieselbe leuchtend rote (bzw. rot-violette) Nuance nahmen bei dieser Färbung auch andere Struktur-elemente der Präparate, wie Metazoenkerne, Netzsubstanz der Blut-plättchen u. a. an. Durch die Arbeiten von *Nocht*<sup>45</sup>), *Michaelis*<sup>13</sup>), *Giemsa*<sup>10</sup>) u. a. wurde bewiesen, daß diese spezifische Färbung nur dann zustande kommt, wenn im Gemisch ein besonderer Farbstoff vorhanden ist, der bei der sog. Reifung der Methylenblaulösungen entsteht, Methylenazur oder Azur benannt. Es wurden deshalb die Substanzen, die nur durch *Romanowsky*-Mischungen darstellbar sind, als spezifisch „azurophil“ bezeichnet. Die Literatur über das Methylenazurproblem s. *Baudisch* und *Unna*<sup>63</sup>).

Um etwaige Mißverständnisse zu vermeiden, muß betont werden, daß manche Strukturelemente der Präparate außer der azurophilen Substanz noch andere chemische, auch andersartig färbbare Körper enthalten, was selbstverständlich die endgültige Nuance dieser Elemente wesentlich beeinflußt. *Spezifisch azurophil* sind die Protozoenkerne, die Netzsubstanz der Blutplättchen, die sog. azurophile Lymphocytenkörnung und manche andere Substanzen [vgl. *Pappenheim*<sup>50</sup>), *Prowazek*<sup>54</sup>)].

Als *Romanowsky-Effekt* bezeichnen wir ausschließlich die leuchtend-rote (bzw. rotviolette) Färbung der azurophilen Substanzen, nicht aber, wie es *Scott*<sup>59</sup>) behauptet, „production of a blue colour in basophil cytoplasm and violet to magenta in nuclei or some other structures“ (p. 302).

Als den *Romanowsky*-Effekt erzeugend können nur diejenigen Farb-lösungen gelten, die sämtliche azurophilen Substanzen, und zwar in einer leuchtenden Nuance darstellen, nicht aber solche Lösungen, die

nur den Metazoenkernen eine rötliche oder violette Nuance verleihen, wie z. B. die Lösung Nr. 1 von *Scott*. *Unnas* Theorie der *Giemsa*-Färbung, auf die wir noch später zurückkommen werden, ist schon deshalb nicht zutreffend, weil er in seinen Versuchen bloß schwachviolette und rötliche, nicht aber leuchtende Nuancen erzielte.

Seitdem die Unentbehrlichkeit des Methylenazurs für die Darstellung der azurophilen Substanzen festgestellt worden war, wurde die technische Seite der Herstellung der entsprechenden Lösungen vervollkommenet [*Michaelis*<sup>31</sup>), *Leishman*<sup>26</sup>), *Giemsa*<sup>10, 11</sup>), *Reuter*<sup>56</sup>), *Marino*<sup>28</sup>), *May*<sup>20</sup>), *Pappenheim*<sup>47, 48</sup>). Vgl. *Martinotti*<sup>29</sup>) (Literatur!). Die Theorie der Färbung blieb aber trotz vielen Bemühungen, wie schon oben erwähnt wurde, unaufgeklärt. Es konnte nicht befriedigend erklärt werden, in welcher Weise die vorwiegend basophilen Substanzen der Metazoen- und Protozoenkerne im Gemische eines (oder mehrerer) blauen basischen und eines roten sauren Farbstoffes die spezifische leuchtend rote Farbe annehmen. Ich habe mir als Aufgabe gestellt, den Mechanismus dieser Färbung zu erforschen.

## II. Die Rolle des Eosins.

Zunächst sollte die Wirkungsweise des Eosins aufgeklärt werden. Wirkt das Eosin bei der Erzeugung des *Romanowsky*-Effekts als Farbstoff, Beize oder „metachromasierende“ Substanz?

Sollte das Eosin, wie es *Pelet-Jolivet*<sup>53</sup>), *Unna*<sup>63, 64, 65</sup>) u. a. annehmen, als Beize wirken, dann müßte es die azurophilen Substanzen direkt färben. Eosin allein färbt sie aber entschieden nicht. Die Beizenrolle des Eosins wollte *Unna* durch die Färbung nach *Harris*<sup>15</sup>) (Eosinlösung 1 : 1000 1/2—2 Min., dann abgießen, abspülen, 20 Min. färben mit einer alkalischen Methylenblaulösung) bekräftigen. Man kann aber aus der Reihenfolge der Anwendung der Farbstofflösungen nicht auf die Beizenrolle des Eosins schließen, da bei umgekehrter Reihenfolge die Färbung noch besser gelingt. Verfolgen wir den Färbungsprozeß nach *Harris*, so bemerken wir, daß das Präparat durch die Eosinlösung stark überfärbt wird. Bringen wir das nach der Eosinfärbung abgespülte Präparat in destilliertes Wasser, oder gießen wir eine schwache Methylenblaulösung darauf, so sehen wir deutlich, wie das Präparat „blutet“: das destillierte Wasser wird rötlich, auch in die Methylenblaulösung wird Eosin abgegeben, und es kann sogar zur Bildung eines Niederschlages kommen. Bei der Nachfärbung mit der alkalischen Methylenblaulösung geht also ein Teil des Eosins vom Präparate in die Farblösung über, und nur dann aus dem entstandenen Gemische des sauren mit den basischen Farbstoffen kommt die spezifische Färbung der Kerne, die nach der Eosinfärbung farblos geblieben sind, zustande.

Nach *Neumann*<sup>44)</sup>, *Lee-Mayer*<sup>25)</sup> u. a. wirkt das Eosin nicht als Farbstoff, sondern als chemischer Körper, der auf das Methylenblau (oder das Methylenazur) eine metachromasierende Wirkung ausübt. Die erwähnten Autoren glaubten, man könnte das Eosin durch andere zum Teil farblose chemische Körper ersetzen. Auch *Pappenheim*<sup>51)</sup> führte den Ausdruck „Säuremetachromasie“ (es wurde die Metachromasie des basischen Farbstoffes unter dem Einflusse der Eosinsäure gemeint) an. Aus den von mir angestellten Versuchen ging hervor, daß das Eosin durch Kaliumbichromat, Resorcin, Tannin und manche anderen Substanzen, die eine ähnliche Wirkung der Meinung der erwähnten Autoren nach ausüben könnten, doch nicht ersetzt werden kann. Der *Neumannsche Effekt* (Rötung der Kerne des mit Methylenblau gefärbten Präparats bei Tannineinwirkung) fällt mit dem *Romanowsky-Effekt* nicht zusammen, da nur ein Teil der azuophilen Substanzen, und zwar in einer matten Nuance auf diese Weise darstellbar ist [*Moschkowski*<sup>41)</sup>].

Es konnte daher von einer *metachromasierenden oder Beizenrolle des Eosins keine Rede* sein.

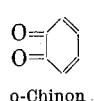
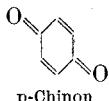
Es sollten weiter noch die Rolle des Methylenazurs und die Beziehungen der beiden Farbstoffe in der Lösung untereinander und zum Substrat aufgeklärt werden.

### III. Die Rolle des Azurs.

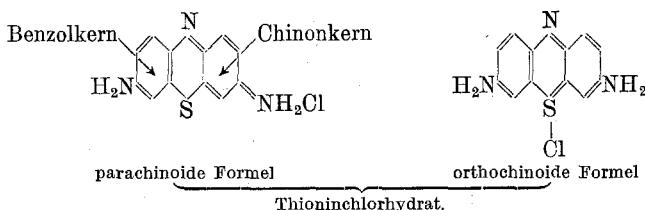
Im Beginne der Versuche habe ich Färbungen mit Azur I ausgeführt. Bei singulärer Färbung mit Azur kam es nie zu einer leuchtenden Nuance der azuophilen Substanzen. Sie bekamen aber, wie in den Versuchen von *Giemsa*<sup>45)</sup>, *Michaelis*<sup>31)</sup> u. a., eine schwach rötliche (violette) Nuance. Da das Azur I ein Gemisch mehrerer Farbstoffe darstellt, habe ich dieselben Versuche mit seinen einzelnen Komponenten — asymmetrischem Dimethylthionin und Trimethylthionin wie auch mit Thionin und manchen anderen Farbstoffen der Thiazinreihe angestellt.

#### 1. Chemisches über Thiazinfarbstoffe.

Die Farbstoffe, zu denen das Methylenblau, wie auch die Komponenten des Azurs gehören, sind als Abkömmlinge des Thionins anzusehen. Sie gehören zu den Thiazinfarbstoffen, und ihre Moleküle enthalten einen Benzol- und einen Chinonkern. Die Chinone können, wie bekannt, eine ortho- oder eine para-Formel haben:

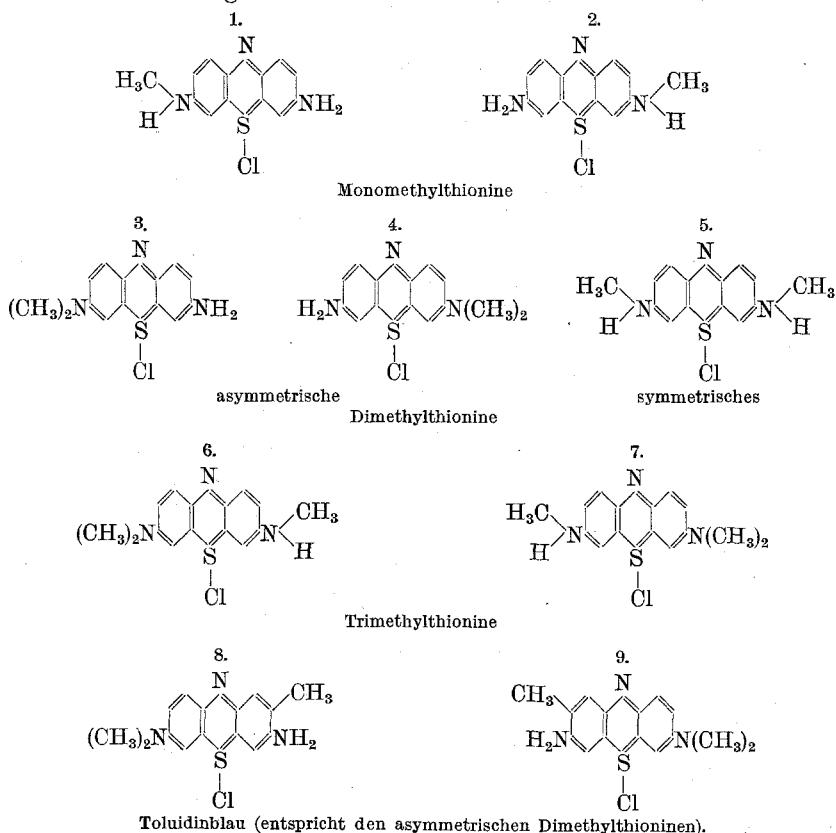


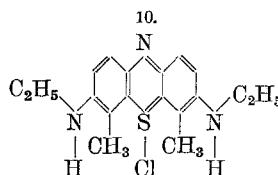
Auch die Strukturformeln der Thiazinfarbstoffe können ortho- oder parachinoid dargestellt werden.



Die Wasserstoffatome an den seitlichen Stickstoffatomen des Thionins können durch Alkylradikele ersetzt werden. Es entstehen auf diese Weise Monomethyl- (resp. Monoäthyl- usw.), Dimethyl-, Trimethylthionin und Methylenblau=Tetramethylthionin. Die Farbstoffe, in deren Molekülen alle 4 Wasserstoffatome der seitlichen Stickstoffatome durch Alkylradikele ersetzt sind, werden als peralkyliert bezeichnet. Außer dem Methylenblau sind es Methylengrün, Thioninblau GO u. a.

Die nicht peralkylierten Thioninderivate und Homologen können theoretisch die folgenden Isomerien aufweisen:





Neumethylenblau N entspricht dem symmetrischen Dimethylthionin.

Die Formeln könnten auch parachinoid geschrieben werden.

Die Isomerie der Thiazinfarbstoffe muß immer im Auge behalten werden, wenn wir die widersprechenden Angaben der Autoren über ihre färberischen Eigenschaften vergleichen. So wird meistens von Dimethylthionin oder Trimethylthionin gesprochen, ohne den Umstand zu berücksichtigen, daß es mindestens 3 verschiedene Dimethylthionine und 2 Trimethylthionine geben kann und in praxi wir immer mit Gemischen zu tun haben, in denen das eine oder das andere Isomer überwiegt.

## 2. Die Metachromasie und der Romanowsky-Effekt.

Meine Versuche ergaben in Übereinstimmung mit *Michaelis*<sup>31), *Neisser*<sup>43),</sup> (*Ehrlich*), *Scott*<sup>59)</sup> u. a., daß das Thionin und manche seiner nicht peralkylierten Derivate und Homologen bei singulärer Anwendung die azuropilen Substanzen in einer rötlichen Nuance färben. Es erwiesen sich die erwähnten Farbstoffe den azuropilen Substanzen gegenüber als *metachromatisch*, letztere gegenüber den genannten Farbstoffen als *chromotrop*. Ich bezeichnete der Kürze wegen diejenigen nicht peralkylierten Derivate und Homologen des Thionins, die diese metachromatischen Eigenschaften besitzen, als *Farbstoffe der Azurgruppe* oder als *Azurfarbstoffe*. Von diesen Farbstoffen standen mir zur Verfügung Thionin, Toluidinblau (Formel 8), Dimethylthionin asymm. (Formel 3) und Trimethylthionin (Formel 6) (*Grübler*)\*).</sup>

Mit allen diesen Farbstoffen gelang es bei gleichzeitiger oder nachträglicher Eosineinwirkung, eine spezifische Färbung der azuropilen Substanzen der Blutplättchen, Protozoenkerne usw. zu erzielen. Ich verwandte zu diesem Zwecke Malariablutpräparate und konnte mich von der guten Färbung der Kerne auch in den Gametocyten überzeugen. Auch schöne Trypanosomen- und Leishmanienfärbungen konnten auf diese Weise erzielt werden.

Die Fähigkeit der Azurfarbstoffe, den *Romanowsky*-Effekt (in Kombination mit Eosin) hervorzurufen, steht also mit ihren metachromatischen Eigenschaften im Zusammenhange, da chemisch reines Methylen-

\*) G. Grübler (Leipzig) spreche ich hiermit meinen verbindlichsten Dank für die mir durch die Vermittlung des Deutschen Roten Kreuzes bereitwilligst gelieferten Farbstoffe aus, ebenfalls Herrn Dr. H. Zeiss, Deutsches Rotes Kreuz (Moskau).

blau, wie auch andere völlig alkylierte Farbstoffe derselben Reihe, keine metachromatischen Eigenschaften besitzen und den *Romanowsky*-Effekt (bei gleichzeitiger oder nachträglicher Eosineinwirkung) hervorzurufen nicht imstande sind.

Es konnte daher als empirische Regel aufgestellt werden, daß diejenigen Farbstoffe der Thiazinreihe zur Erzeugung des *Romanowsky*-Effekts brauchbar sind, welche schon bei singulärer Anwendung den azurophilen Substanzen eine rötliche Nuance beibringen, und umgekehrt, daß diejenigen Substanzen sich spezifisch rot aus einem *Romanowsky*-Gemische färben können, welche bei singulärer Färbung mit einem Azurfarbstoffe eine von der Farbe der anderen Elemente des Präparats abweichende rötliche Nuance annehmen.

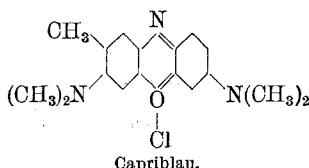
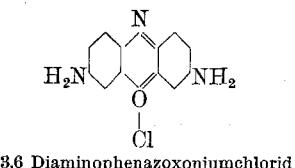
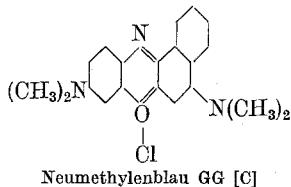
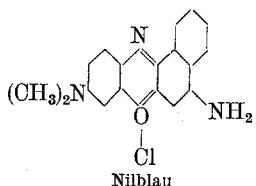
### 3. Das Wesen der Metachromasie.

Die Azurfarbstoffe unterscheiden sich von den peralkylierten auch in der Farbe ihrer Lösungen. Während die Farbe der Lösungen der peralkylierten Thiazinfarbstoffe beim Verdünnen nur eine Abschwächung erfährt, verändern sich die Nuancen der Azurfarbstofflösungen auch qualitativ: die Farbe ihrer konzentrierten Lösungen neigt zu violett; durch Verdünnen mit Wasser sowie durch Erhitzen oder Ansäuern schlägt sie nach blau um. Vgl. *Kehrmann*<sup>17</sup>), *Scott*<sup>59</sup>). Das-selbe ist bei der spektroskopischen Untersuchung ersichtlich. So zeigt das Thionin, z. B. in konzentrierten Lösungen — von der schwachen Absorption im Bereich des Grün abgesehen — eine sattelförmige Absorptionskurve; in verdünnter Lösung dagegen eine (flachere) bogenförmige, die nach der linken Seite (nach den längeren Wellen) der vorherigen sattelförmigen verschoben ist [*Formanek*<sup>9</sup>]). Es scheint, als ob in der konzentrierten Lösung ein Gemisch eines bläulichen mit einem mehr violetten Stoff bestehe und letzterer sich beim Verdünnen in den ersten umwandele.

Die metachromatischen Eigenschaften und die Fähigkeit des Farbenumschlages beim Verdünnen haben die Azurfarbstoffe gemeinsam mit denjenigen Farbstoffen anderer Gruppen, bei denen die Wasserstoffatome an den seitlichen Stickstoffatomen nicht bis zum letzten durch Alkyradikale ersetzt sind. Es besteht auch in den anderen Farbstoffgruppen, wie in der Azin-, Oxazin-, Triphenylmethanreihe u. a., ein Unterschied zwischen den peralkylierten und den nicht komplett alkylierten Verbindungen, und zwar sind nur letztere Farbstoffe zur Metachromasie geneigt [*Michaelis*<sup>32</sup>]) und die Nuancen ihrer Lösungen durch Verdünnen, Ansäuern usw. qualitativ verändert worden.

In der Oxazinreihe z. B. sind die nicht komplett alkylierten Farbstoffe Nilblau und 3,6 Diaminophenazoniumchlorid zur Metachromasie geneigt, während die ihnen entsprechenden peralkylierten Farbstoffe, wie Neumethylenblau GG und Capriblau keinen Farben-

umschlag beim Verdünnen der Lösungen zeigen und keine metachromatischen Eigenschaften besitzen.



Beispiele aus der Triphenylmethan- und Safraninreihe s. u.

Dieser Unterschied zwischen den peralkylierten und den nicht vollständig alkylierten Farbstoffen hat höchstwahrscheinlich darin seinen Grund, daß die letzteren noch mindestens ein Wasserstoffatom am seitlichen Stickstoffatom (ein bewegliches Amido- resp. Iminowasserstoffatom [*Hantzsch*<sup>14</sup>]) besitzen und deshalb zur Tautomerie befähigt sind: es finden sich in ihren Lösungen 2 Chromoisomere in labilem Gleichgewichtszustande. Der Farbenumschlag der Lösungen durch Verdünnen oder Ansäuern usw. kann dadurch erklärt werden, daß in konzentrierten neutralen Lösungen das eine Chromoisomer die Oberhand hat, in verdünnten oder angesäuerten Lösungen sich ein gewisser Teil des Farbstoffes in das zweite Chromoisomer umwandelt.

Der Farbenumschlag der Indikatorenlösungen beruht nach *Hantzsch*<sup>14</sup>) auf dem Übergange des einen Chromoisomeren in das zweite. Die Umlagerung der Ortho- in die Paraform ist von *Pummerer* und *Gaßner*<sup>55</sup>) als Ursache des Farbenumschlages für das Thiazonchlorhydrat angenommen (Thiazonchlorhydrat  $\rightleftharpoons$  Oxyphenazthioniumchlorid).

Die Tautomerie der metachromatischen Farbstoffe ist schon vielmals als Ursache ihrer *metachromatischen Eigenschaften* angenommen worden [*Michaelis*<sup>32, 35</sup>), *Giemsa*<sup>12</sup>) u. a.]: Finden sich in der Lösung eines chemisch reinen Farbstoffes zwei Chromoisomere, so binden die meisten Strukturelemente des Präparats das eine Chromoisomer, die „chromotropen“ — das zweite.

#### 4. Die singuläre Färbung mittels Lösungen der Azurfarbstoffe.

Auch die besondere Stellung der Azurfarbstoffe in der Thiazinreihe könnte darin ihren Grund haben, daß sie zur Tautomerie befähigt sind. Diejenigen Thiazinfarbstoffe, die kein bewegliches Wasserstoffatom

am seitlichen Stickstoffatom besitzen, können nur *eine* Strukturformel haben, und zwar muß für das peralkylierte Methylenblau die Para-formel angenommen werden<sup>21, 55)</sup>. In einer Lösung des Methylenblau haben wir nur eine Art der Moleküle oder der Ionen des Farbstoffes. Was aber die *Azurfarbstoffe* betrifft, so sind ihre von den anderen Verbindungen der Thiazinreihe abweichenden Eigenschaften dadurch zu erklären, daß sie in wäßriger Lösung *2 Chromoisomere* bilden. Das eine Chromoisomer soll rein blau, das zweite mehr rötlich (violett) sein. Die beiden Tautomere befinden sich in der Lösung in labilem Gleichgewichtszustande. In konzentrierten wäßrigen Lösungen eines Azurfarbstoffes besteht ein beträchtlicher Prozentsatz der Farbstoffmoleküle (resp. Ionen) als rötliches Tautomer, wodurch die violette Nuance der Lösung bedingt wird. Beim Verdünnen der Lösung, beim Erwärmen oder Ansäuern wird das Gleichgewicht zugunsten des blauen Tautomers verschoben; die rein blauen verdünnten Lösungen enthalten einen sehr kleinen Prozentsatz des rötlichen Tautomers.

Bringen wir eine verdünnte wäßrige Lösung irgendeines Azurfarbstoffes auf das Präparat, so erweist sich, daß einige Substanzen nur vom rötlichen Tautomer angegriffen werden, durch das blaue werden sie nicht gefärbt. Diese Substanzen binden die in der Lösung spärlich befindlichen Ionen (vgl. unten) des rötlichen Tautomers, letztere werden aber in der Lösung von neuem gebildet, da ein Teil des blauen Tautomers sich nach dem Gleichgewichtsgesetze in das rote umwandelt [vgl. *Kehrmann*<sup>20)</sup>]. Auf diese Weise können einige Substanzen aus der anscheinend rein *blauen* Lösung *rötlich* gefärbt werden. Es sind die *azurophilen* Substanzen.

Obgleich im beschriebenen Falle eine Lösung eines *chemisch reinen* Farbstoffes angewandt wird, ist doch diese Färbung denjenigen analog, bei welchen wir eine *Mischung von 2 basischen Farbstoffen*, z. B. Methylgrün-Pyronin, anwenden; sie unterscheidet sich nur dadurch, daß das rötliche Tautomer immer aus dem blauen, wenn auch in kleinsten Mengen gebildet wird. Die Analogie mit der Methylgrün-Pyronin-Mischung kann noch cytologisch weiter verfolgt werden [vgl. *Pappenheim*<sup>52)</sup>]\*).

##### 5. Die Strukturformeln der Chromoisomere der Azurfarbstoffe.

Auf Grund der in der chemischen Literatur herrschenden An-

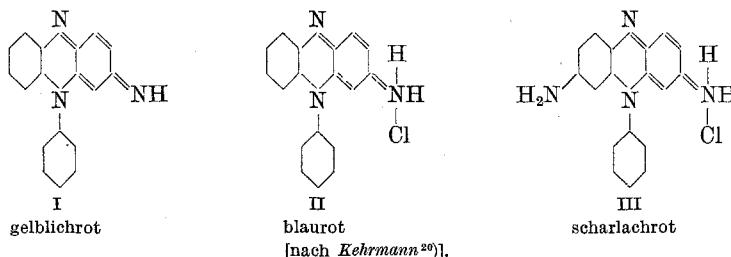
---

\*) Man soll aber doch nicht alles, was nach *Romanowsky* rot, wie alles, was mit Methylgrün-Pyronin grün gefärbt wird, als Chromatin bezeichnen. Obwohl *v. Wasielewski*<sup>36)</sup> 1900 und *Michaelis*<sup>38)</sup> 1902 davor warnten, kann man noch in der neuesten Literatur von den Chromatinfäden (gemeint sind Geißeln) der Trypanosomen lesen [*Abramow*<sup>1)</sup>, Atlas, Tafel IV, XVIII, Abb. 29, 227, 229 u. a.]. S. auch *Neumann u. Mayer*. Die wichtigsten tierischen Parasiten. Artikel Trypanosomen. S. 28.

schauungen können wir uns das eine Tautomer der Azurfarbstoffe als eine orthochinoide, das zweite als eine parachinoide Verbindung vorstellen\*). Aus dem Studium der Spektren wie auch aus dem Dichroismus schließt *Kehrmann*<sup>20)</sup>, daß „das einsäurige 1—3 Diamin (des Phenazthionium; d. h. das Thioninchlorhydrat) ein im Gleichgewicht befindliches Gemisch von ortho- und parachinoidem Salz sei“.

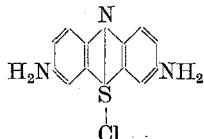
Es erweist sich weiter am passendsten, dem blauen Tautomer die para-, dem rötlichen die orthochinoide Formel zuzuschreiben, denn die Amido- resp. Iminogruppe, die in der Paraverbindung als Stelle der Salzbildung wirkt, bleibt in der Orthoverbindung frei [vgl. *Michaelis*<sup>32)</sup>, *Scott*<sup>59)</sup>]. Es sprechen für diese Annahme viele Analogien. Die Amido-gruppen an den 3,6 Stellen wirken in der Thiazinreihe, wie auch in den Safranin-, Oxazin- und anderen Chinonimidfarbstoffgruppen, die Farbfähigkeit erhöhend, d. h. in der Richtung von blau zu rot verschiebend. Die Salzbildung an diesen Amido-gruppen wie auch das Ersetzen ihrer Wasserstoffatome durch Alkylradikale heben die rötende Wirkung auf [*Kehrmann*<sup>19)</sup>].

Die Aposafraninbase (I) ist gelblichrot. Die Salzbildung an der Amido-gruppe vertieft die Farbe bis zu blaurot (II); die zweite Amido-gruppe, an die Stelle 6. eingeführt, erhöht die Färbekraft wieder (III).

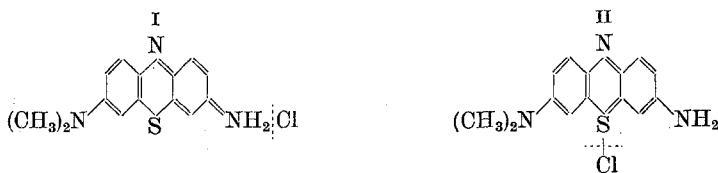


Führen wir für die Azurfarbstoffe den wichtigsten Bestandteil des sog. Methylenazurs, das asymmetrische Dimethylthionin, als Beispiel an, so würde die parachinoide Formel (I) dem blauen, die orthochinoide (II) dem rötlichen Tautomer entsprechen

\*) Auch andere Formeln können für die Thiazinverbindungen mit Recht vorgeschlagen werden, wie z. B.



für das Thionin. — Die Struktur der sog. Chinonimidfarbstoffe kann noch nicht als völlig aufgeklärt betrachtet werden. Es stehen noch große Fortschritte auf diesem Gebiete bevor, welche auch die Anschauchungen über einige Seiten des Prozesses der Azureosinfärbung vielleicht ändern werden.



Die Dissoziation der Farbstoffsalze findet an den punktierten Linien statt.

#### 6. Das Wesen des Färbungsprozesses.

Als Grundlage für die weiteren Ausführungen diente die Anschauung, daß wir es bei der *Romanowsky*-Färbung vorwiegend mit Prozessen der chemischen Bindung der Farbstoffionen zu tun haben, da alle angewandten Farbstoffe echte Lösungen bilden und in wäßriger Lösung völlig zu Ionen dissoziieren [*Michaelis*<sup>37), *Krafft*<sup>24), *Teague* und *Buxton*<sup>61)</sup> u. a.], die Färbung aber des histologischen Präparats (mit Ausnahme von fettartigen und anderen wenigen Substanzen) zum größten Teil als eine Ionenadsorption im Sinne von *Michaelis*<sup>37, 38)</sup> angesehen werden kann [vgl. *Herxheimer*<sup>16), *Becher*<sup>4), *Kolthoff*<sup>23)</sup>], zumal die Adsorption von Ionen im allgemeinen in der neuesten Literatur als vorwiegend durch chemische Kräfte veranlaßt betrachtet wird [*Mukherjee*<sup>42), *Paneth* und *Horovitz*<sup>46)</sup> u. a.].</sup></sup></sup></sup></sup>

*Michaelis*<sup>38)</sup> ist der Meinung, daß „das Methylenblaukation in derselben Weise an das Eiweiß gebunden wird, wie das Wasserstoffion“. „... die Substrate der histologischen Färbung ... ziehen die sauren und basischen Farbstoffe durch eine chemische salzartige Bindung an.“ Auch *Kestner*<sup>22)</sup> findet, daß Methylenblau und Eosin mit dem Eiweiß wirkliche Salze bilden.

Die Beschleunigung der Färbeprozesse bei Temperaturerhöhung spricht ebenfalls für ihre *chemische Natur*.

#### 7. Die Beizenvolle des rötlichen Tautomers.

Im Falle einer Azurfarbstofflösung wird die Färbung durch die Bindung der positiven Farbstoffionen hervorgerufen. Es wird eine salzartige Verbindung Farbstoff-Substrat gebildet, wobei das Farbstoffkation, wie es im Molekül des Farbstoffes an das Cl'-Anion gebunden war, jetzt sich an das negativ geladene Substrat bindet. Blau werden dabei diejenigen Elemente des Präparats gefärbt, die das blaue Farbstoffion, und zwar an derselben Seitenkette, wo vorher das Cl'-Anion gebunden war, d. h. am seitlichen Stickstoffatom binden. Das rötliche Farbstoffion wird aber von den chromotropen (azurophilen) Strukturlementen des Präparats, wie es aus der Strukturformel (II) ersichtlich ist, gebunden.

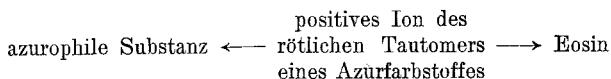
Da das *Kation des rötlichen Tautomers*, nachdem es an das Substrat gebunden wird, noch eine freie Amidogruppe (resp. Imidogruppe im Falle von symmetrischen Dimethylthionin und Trimethylthionin, s. o. Formeln 5, 6) besitzt, so ist es noch imstande, bei gleichzeitiger oder nachträglicher Eosineinwirkung an dieser Gruppe *das Eosin zu binden* und auf diese Weise gewissermaßen *als ein Amboceptor zu wirken*. Das blaue Kation, wie es aus der Strukturformel (I) anschaulich wird, besitzt diese amboceptore Eigenschaft nicht.

Dadurch wird die oben angebrachte empirische Regel aufgeklärt: diejenigen *basophilen Strukturelemente* der Präparate, die nach *singulärer Färbung mit einem Azurfarbstoffe* eine *rötliche Nuance bekommen*, sind durch das *rötliche Tautomer des Farbstoffes* gebeizt, und bei *nachträglicher oder gleichzeitiger Eosinzufügung* wird *das Eosin an diese Beize gebunden*.

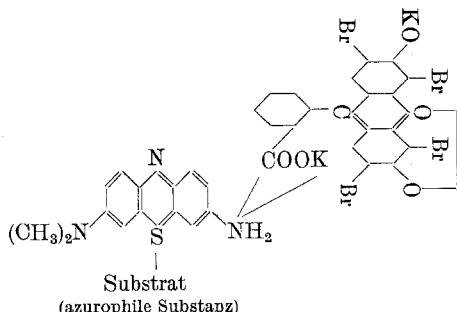
#### IV. Der Mechanismus der Azureosinfärbung.

##### 1. Bildung eines komplexen Salzes.

Die Darstellung der azurophilen Substanzen nach *Romanowsky* kommt also durch einen *adjektiven* Färbungsprozeß zustande, wobei die Rolle der Beize das rötliche Ion des Azurfarbstoffes spielt, an dessen Amido- resp. Imidogruppe das Eosin gebunden wird, und zwar höchstwahrscheinlich nicht als Ion, sondern *in toto*. Und wenn die Verbindung *Substrat — positives Ion* ein echtes Salz darstellt, ist die Tripelverbindung, die bei der spezifischen *Romanowsky*-Färbung entsteht:



oder vielleicht so



in ihrem 2. Teile: positives Ion-Eosin, ein komplexes Salz. Die Eosinbindung gehört folglich zu denjenigen Vorgängen, die ebenfalls auf rein chemischem Wege erklärt werden können und „auf dem Zustande-

kommen chemischer Additionsverbindungen beruhen“ [Becher<sup>4)</sup>, Fußnote S. 157].

### 2. Kolloidale Hülle.

Da die komplexe Verbindung Eosin-Azurfarbstoffion 69 Atome enthält, so besitzt sie einen kolloidalen Charakter, wie es aus den Ausführungen von W. Bilz<sup>6)</sup> folgt: Farbstoffe bis zu ca. 45 Atome im Molekül diffundieren rasch, solche mit 50—70 nur wenig, Farbstoffe mit mehr als 70 Atomen im Molekül dialysieren meist nicht.

Die erwähnte Verbindung bildet auf der Oberfläche der betreffenden Strukturelemente des Präparats einen kolloidalen Niederschlag, wodurch sie etwas größer als bei einer rein substantiven Färbung dargestellt werden [vgl. Prowazek<sup>54)</sup>].

Die kolloidalen Eigenschaften der gebildeten Hülle sprechen aber nicht im geringsten gegen die chemische Natur des Färbungsprozesses. Es ist derselbe Vorgang, wie im bekannten Pfefferschen Versuch, bei dem aus den krystalloiden Verbindungen  $\text{CuSO}_4$  und  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$  das kolloidale  $\text{Cu}_2\text{Fe}(\text{CN})_6$  gebildet wird.

Dieser Umstand soll von sehr intensiven Romanowsky-Färbungen warnen, da sie die feine Struktur der azurophilen Elemente verwischen, wie es z. B. bei der Argutinsky<sup>3)</sup>-Methode der Fall ist, wo der Kern des Malariaplasmodiums sich mit dem kolloidalen Niederschlage, wie mit einer harten Kappe, überzieht.

### 3. Der Romanowsky-Semieffekt.

Manche Einzelheiten der Struktur der azurophilen Elemente werden sogar genauer bei singulärer Färbung mit einer Lösung eines Azurfarbstoffes dargestellt. So erweist sich z. B., daß der Kern des halberwachsenen Malariaischizonten, mit einer ganz schwachen Tolidinblau- oder Thioninlösung gefärbt, nicht pyknotisch aussieht, sondern ein Bläschen mit einer Karyosome und sehr zartem Netzchen von Fäden, die die periphere Schicht mit der Karyosome verbindet, darstellt.

Da die rötliche Nuance, die den azurophilen Substanzen mittels Lösungen der Azurfarbstoffe (ohne Eosinzufügung) verliehen wird, eine gewisse Ähnlichkeit mit dem endgültigen Romanowsky-Effekt hat, in Wirklichkeit aber nur eine Vorbereitungsstufe zum vollständigen Romanowsky-Effekt darstellt, habe ich diese schwach rötliche (violette) Färbung als Romanowsky-Semieffekt bezeichnet<sup>40)</sup>.

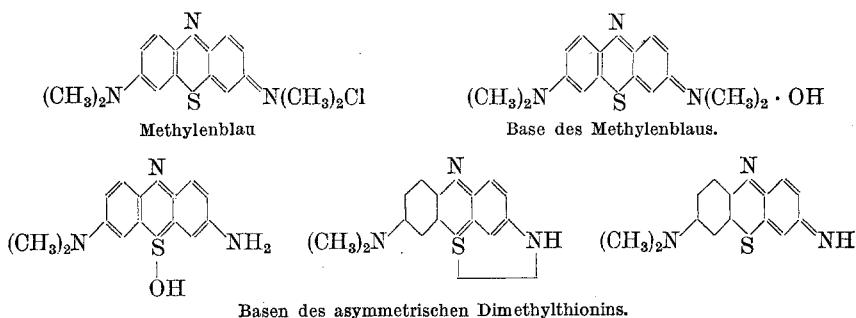
## V. Theoretisches über die Präparation von Methylenblaulösungen für die Romanowsky-Färbung.

Um für die Romanowsky-Färbung brauchbar zu sein, muß die Methylenblaulösung Farbstoffe der Azurgruppe enthalten. Die bekannte Methode der Prüfung der Methylenblaulösung, die auf einer

Chloroform- [*Nocht*<sup>45</sup>]) resp. Ätherausschüttelung des „Rot aus Methylenblau“ beruht, besteht eigentlich in der Entdeckung der Farbstoffe der Azurreihe, nicht aber der angeblichen Sulfonverbindung, wie man sich das Methylenazur vorgestellt hat. Es soll eigentlich die Bezeichnung „Methylenazur“ völlig verschwinden, da sie keinem chemischen Individuum entspricht und nur zu Mißverständnissen führt.

Obgleich schon 1902 *Michaelis*<sup>33</sup>) die Sulfonformel des Methylenazurs bezweifelte und später wirklich *Kehrmann*<sup>17</sup>) das Methylenazur als Gemisch von Di- und Trimethylthioninen anerkannte [s. a. *Bernthsen*<sup>5</sup>]), wird die Sulfonformel von *Pappenheim* noch 1911<sup>49</sup>) wie auch in der nach seinem Tode erschienenen „Morphologischen Hämatologie“ (1919)<sup>52</sup>) und ebenfalls in der neuesten Zeit von russischen Autoren [*Savatejew*<sup>48</sup>]) angeführt. Auch *Tribondeau*<sup>62</sup>) bemüht sich, das Methylenazur aus Methylenblau zu gewinnen, obgleich es viel ratsamer wäre, einen Azurfarbstoff oder ein genaues Gemisch mehrerer Azurfarbstoffe zwecks Anfertigung der *Romanowsky*-Lösungen anzuwenden. Cf. *Scot*<sup>59</sup>).

Schüttelt man eine alkalisierte Methylenblaulösung (chemisch rein) mit Äther aus, so bleibt der Äther farblos, da Methylenblau ein Ammoniumsalz darstellt und die in alkalischer Lösung gebildete Ammoniumbase in Äther unlöslich ist [*Kehrmann* u. a.<sup>18</sup>]). Bleibt aber die Lösung stehen, so wird das Methylenblau teilweise zersetzt, und unter anderen Stoffen entstehen bei Abspaltung von 1 oder 2 Methylradikalen (zum Teil als Methylalkohol) Tri- und Dimethylthionine, die zur Tautomerie befähigt sind, und deren Basen in Äther mit roter Farbe löslich sind.

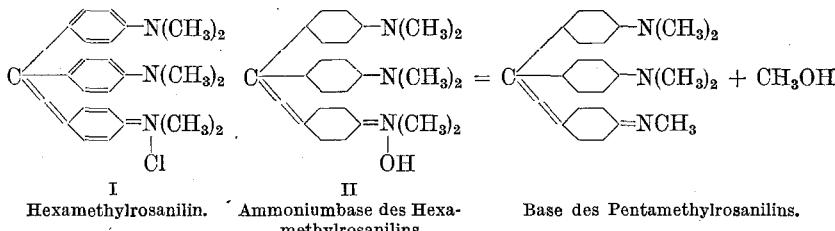


Auf der Bildung von Azurfarbstoffen aus Methylenblau in alkalischer Lösung beruhen alle alten, wie auch die neuen [*Cretin*<sup>7</sup>) *Adam*<sup>2</sup>) u. a. m.] Methoden der Präparation von Methylenblaulösungen für die *Romanowsky*-Färbung.

Ähnlichen Prozessen begegnen wir auch in anderen Farbstoffreihen. In der Triphenylmethanreihe geht die beim Alkalisieren der Lösung gebildete Ammoniumbase der nicht peralkylierten Verbindungen unter

Wasserabspaltung in eine Iminbase über, die in Äther mit gelbroter Farbe löslich ist. Bei den peralkylierten Farbstoffen wird Methylalkohol abgespalten: die gebildete ätherlösliche Base entspricht dann schon nicht dem ursprünglichen Farbstoff, sondern einer Verbindung, die an ein Methylradikal ärmer als der Ausgangsfarbstoff ist.

Die Ammoniumbase des Hexamethylrosanilins (II) (vorwiegender Bestandteil des Methylviolett oder Kresylviolett) ist in Äther unlöslich. In alkalischer Lösung wird durch Methylalkoholabspaltung eine ätherlösliche Base gebildet, die dem Pentamethylrosanilin entspricht.



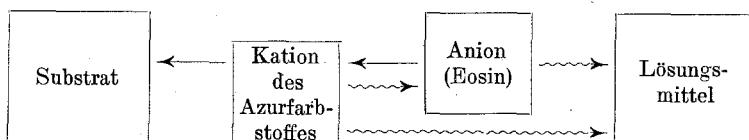
Eine Methylviolettlösung, die, wie bekannt, metachromatische Eigenschaften besitzt, ist ganz analog einer für die *Romanowsky*-Färbung brauchbaren Methylenblaulösung, sie enthält außer dem peralkylierten Farbstoffe auch eine gewisse Menge nicht komplett alkylierter Verbindungen, die zur Tautomerie befähigt sind.

In der Safraninreihe finden ebenfalls ähnliche Prozesse statt. Aus dem (peralkylierten) Tetraäthylsafranin entsteht in alkalischer Lösung Triäthylsafranin — ein metachromatischer Farbstoff [*Kehrmann*<sup>18)</sup>].

## VI. Einige Bedingungen der Azureosinfärbung.

In einem *Romanowsky*-Gemisch kommen die negativen roten Eosinionen und die positiven blauen zum Teil auch rötlichen Farbstoffionen (des Azurfarbstoffes) vor. Es besteht eine Neigung dieser entgegengesetzgtgeladenen Ionen, sich zu verbinden, wobei ein schwer lösliches Salz gebildet wird. Es kommt also ein Wettstreit zwischen den Eosinionen und den basophilen Substanzen vor, da beide eine Affinität zu den Farbstoffkationen besitzen.

Die Verhältnisse können schematisch so dargestellt werden:



In Wirklichkeit sind die Verhältnisse viel verwickelter, da in der Lösung 2 tautomere Arten der Kationen des Azurfarbstoffes vorhanden

sind, unter denen ein labiles Gleichgewicht besteht. Außerdem sind in der Lösung noch Kationen des Methylenblaus vorhanden. Das Eosin kann an alle 3 verschiedenen Kationen verankert werden, und zwar in anderer Weise als bei seiner Bindung mit dem an den azuropheilen Substanzen verankerten rötlichen Kation, da im letzten Falle ein *komplexes* Salz, in den ersteren ein *echtes* Salz gebildet wird.

Aus dem Schema ist zu ersehen, daß die spezifische Färbung nur dann zustande kommt, wenn die Reaktion von rechts nach links in der Richtung der geraden Pfeile verläuft. Es wirken aber auch Kräfte, die das Kation mit dem Eosinanion sich verbinden lassen, wie auch eine Anziehung der beiden Ionen zum Lösungsmittel. Die welligen Pfeile bezeichnen diese Kräfte, die der Reaktion entgegenwirken.

Welche Kräfte die Oberhand gewinnen werden, hängt erstens auf Grund des Massenwirkungsgesetzes von dem Verhältnis der Konzentrationen des Eosins und des basischen Farbstoffes ab. Ist die Konzentration des Eosins zu groß, so geht die Reaktion in der Richtung der Bildung von Azureosinat in Lösung, die azuropheilen Substanzen bleiben aber ungefärbt. Es muß darum zur Erzeugung des *Romanowsky*-Effekts in der Lösung *ein Überschuß der basischen Farbstoffe* vorhanden sein.

Zweitens hängt vieles von der Reaktion der Lösung ab. Die spezifische Färbung der azuropheilen Substanzen kann nur dann stattfinden, wenn ihre Affinität zum rötlichen Farbstoffkation genügend stark ausgesprochen ist. Eine schwach *alkalische Reaktion* begünstigt die Färbung, weil, wie bekannt, die Basophilie der amphoteren Kolloide des histologischen Präparats in alkalischer Lösung verstärkt wird, da bei Vergrößerung des  $p_H$  die sauren Eigenschaften dieser Kolloide schärfer hervortreten.

Bei der Färbung wird immer eine gewisse Menge der in Wasser schwerlöslichen Farbstoff-Farbstoffsalze gebildet, die als Niederschlag ausfallen können. Für die Erzielung des Färbungseffekts ist aber die Bildung eines Niederschlages nicht notwendig, zumal die Salze in einem Überschuß eines der Farbstoffe löslich sind. Man kann auch ohne Niederschlagsbildung schöne Färbungen erzielen. Die Theorie der Färbung im Stadium der Schwebefällung (*Unna*) ist hier nicht anwendbar [vgl. *Herxheimer*<sup>16</sup>]. Die Fällung in einer verdünnten *Giemsa*-Lösung ist nur ein Ausdruck der Alkoholverdunstung, in dem die Farbstoffe gelöst waren, und hat mit der Färbung nur insoweit zu tun, als der Alkohol die Dissoziation der Farbstoffe und infolgedessen die Färbung verhindert und dieselbe erst nach seiner Verdunstung in vollem Maße stattfinden kann.

## VII. Die Darstellung der azuropheilen Substanzen mittels anderer Farbstofflösungen.

Die basische Farbstoffbeize — das Azur I, dessen Anfertigungsweise nicht veröffentlicht ist, und das keinen einheitlichen chemischen Körper darstellt — kann durch chemische Individuen, durch die von mir als *Azurfarbstoffe* bezeichneten Verbindungen der Thiazinreihe ersetzt werden. *Michaelis*<sup>53)</sup> gelang es, das Methylenazur durch Thionin und Toluidinblau zu ersetzen. Ferner hat *Neisser*<sup>49)</sup> gute Färbungen bei Anwendung von chemisch reinem Dimethylthionin (mit Eosin) erzielt; mit Trimethylthionin gelang es ihm hingegen nicht. Auch *Scott*<sup>58)</sup> verwandte mit Erfolg Thionin, Toluidinblau und Dimethylthionin. Mir gelang es, das Azur I durch alle diese Farbstoffe, wie auch durch Trimethylthionin (Formel 6) zu ersetzen. Augenblicklich sind Versuche im Gange, basische Farbstoffe aus anderen Gruppen zu finden, die dieselbe Rolle einer Beize für die azuropheilen Substanzen spielen könnten.

Nicht nur die basische Reize, sondern der saure Farbstoff — das Eosin — ist ebenfalls ersetzbar, und zwar nicht nur durch verwandte Farbstoffe, wie z. B. das Jodeosin, sondern auch durch Pikrinsäure und andere. Zwar werden die azuropheilen Substanzen bei Anwendung von Pikrinsäure in einer etwas abweichenden Nuance und nicht so scharf, wie bei der *Romanowsky-Giemsa*-Methode, zum Vorschein gebracht, doch stellen die Azurfarbstoff-Pikrinsäurefärbungen ein gewisses theoretisches Interesse dar. Die sukzessive Methode von *Epstein*<sup>8)</sup> hat sich auch in praxi gut bewährt\*). Ich konnte ebensowohl bei simultaner Färbung bei Anwendung von Gemischen von Trimethylthionin- (oder Toluidinblau-) mit Pikrinsäurelösungen als auch von mit Wasser verdünnten methylalkoholischen Toluidinblaupikratlösungen schöne Färbungen erzielen.

Noch andere saure Farbstoffe werden jetzt von mir in dieser Richtung geprüft. Und zwar gelang es mir, schon in den Vorversuchen mit verschiedenen *Azurorangegemischen* dieselben Stufen der Kernfärbung, wie wir es bei verschiedenen Azureosinmischungen begegnen, zu erzielen: von den farblosen Kernen nur mit der Darstellung ihrer oxychromatinen Struktur (beim Überschusse von Orange), bis zu den scharf hervorgehobenen durch eine kolloidale Azurorangehülle bekleideten Kernen, deren Farbe einen Mischton von Blau (Blauviolett) mit Orange darstellte. Auch die spezifisch azuropheilen Substanzen werden in einem solchen Mischton dargestellt, besonders scharf tritt die Netzsubstanz der Blutplättchen hervor; die lockeren Kerne der erwachsenen Schizonten des *Plasmodium vivax* sind infolge der schwachen Färbungskraft des Orange schwächer hervorgehoben.

\*) Eine persönliche Bitte Dr. *Epsteins* erfüllend, bemerke ich, daß für seine Methode nur Toluidinblau nach *Hoyer* brauchbar ist.

### VIII. Die Stellung der vorgeschlagenen Theorie zu den bisherigen.

Die vorgetragene Theorie entspricht den Anschauungen von *Michaelis*<sup>33),</sup> *Marino*<sup>28),</sup> *Giemsa*<sup>12)\*,</sup> *Prowazek*<sup>54)</sup> und mancher anderen Autoren, sie geht aber weiter, indem unsere Theorie die Rolle der Azurfarbstoffe als Beize in Zusammenhang mit ihren metachromatischen Eigenschaften auf Grund ihrer chemischen Struktur zu bringen versucht.

Die Theorien von *Neumann*<sup>44),</sup> *Lee-Mayer*<sup>25),</sup> *Pelet-Jolivet*<sup>53)</sup> können von nun an, meines Erachtens, nicht mehr berücksichtigt werden.

Ebenso kann die neueste *Unnasche*<sup>63, 64, 65)</sup> Theorie trotz der ausführlichen chemischen Analyse der Azurfarbstoffe und des Eosins auch nicht mehr anerkannt werden. Sie ist auf folgenden Voraussetzungen gebaut:

„... wenn wir aber von *Michaelis* wissen, daß auch eosinfreies Azur und Toluidinblau die Kerne rot färben können, und wenn *Nocht* zeigen konnte, daß Eosin zur Rotfärbung nicht unbedingt notwendig ist, sondern durch Resorcin, Hydrochinon und verwandte Körper ersetzbar ist, so liegt es doch näher, die definitive Rottfärbung auf das metachromatische Azur *allein* zurückzuführen . . .“

Diese Voraussetzung ist aber falsch, da die ohne Eosin erzielte rötliche Färbung nur dem Semieffekt, nicht aber dem echten *Romanowsky*-Effekt entspricht. Schon die Färbarkeit der azuophilen Substanzen mittels Toluidinblau und Thionin (wenn auch metachromatische) widerspricht der *Unnaschen* Theorie. Der *Romanowsky*-Semi-effekt spricht vielmehr für die *Basophilie* der azuophilen Substanzen, nicht aber für ihre Acidophilie, wie es *Unna* annimmt.

Es lassen sich zudem innerliche Widersprüche in der *Unnaschen* Theorie entdecken. Ist das Eosin (ein Salz einer zweibasischen Säure) imstande, als Amboceptor (Beize) zu wirken, können wir aber dem Phenol oder dem Kalium und Brom kaum eine amboceptore Rolle zuschreiben. Diese Stoffe sind auch als „Vorbeize“ nicht anwendbar und als „Zu-“ oder „Nachbeize“ verleihen sie den azuophilen Substanzen nur eine bläuliche, violette bis schwach rötliche Nuance.

Gegen die Annahme, daß die intensiv rote Färbung der azuophilen Substanzen im *Romanowsky-Giemsa*-Präparat durch die kirschrote Farbe des *Unnaschen* „Thiazins“ bedingt ist, sprechen auch meine Versuche mit Orange. Sollte im Prozesse der Kernfärbung das Orange die Rolle einer Beize für das kirschrote „Thiazin“ spielen, dann mußte die endgültige Farbe der Kerne einen Mischtönen von Kirschrot mit Orange darstellen; das ist aber nicht der Fall: in Wirklichkeit kommt

---

\* ) Auch die von *Giemsa* in seiner nach Abschluß dieses Aufsatzes erschienenen Arbeit<sup>18)</sup> vorgebrachten Tatsachen und Ausführungen treffen mit den meinigen zusammen.

die Kernfärbung auf diese Weise zustande, daß die azuophilen Substanzen durch den schwach rötlichen (rötlichvioletten) Azurfarbstoff (in seiner roten Modifikation\*) gebeizt werden und nachträglich der saure Farbstoff das Orange an diese Farbstoffbeize gebunden wird; es tritt daher in der Nuance der Kerne bei der Azurorangefärbung keine Spur einer kirschartigen Komponente hervor.

### IX. Zusammenfassung.

1. Bei der Färbung der azuophilen Substanzen nach *Romanowsky-Giemsa* spielt das Eosin die Rolle einer färbenden Substanz und in keinem Falle die einer Beize.

2. Das Thionin und manche seiner nicht völlig alkylierten Derivate und Homologen (als Azurfarbstoffe bezeichnet) sind zur Tautomerie befähigt: in der Farbflotte besteht ein Teil ihrer Moleküle (resp. Ionen) in einer rötlichen Form.

3. Die schwach rötliche Färbung, welche die azuophilen Substanzen aus Lösungen der Azurfarbstoffe, ohne Eosin, erwerben (der *Romanowsky-Semieffekt*), ist durch die Bindung der Ionen des rötlichen Tautomers bedingt. Die Ionen der rötlichen Tautomere der Azurfarbstoffe sind aber imstande, nachdem sie mit dem Substrat in eine salzartige Verbindung treten, noch das Eosin chemisch zu binden, wobei ein komplexes Salz gebildet wird.

Die azuophilen Substanzen sind also basophil. Ihre Darstellung nach *Romanowsky* stellt einen *adjektiven* Färbungsprozeß vor, wobei der basische Azurfarbstoff die Rolle einer Beize spielt.

4. Bei der Reifung der Methylenblaulösungen werden aus dem Methylenblau Farbstoffe der Azurgruppe (Azurfarbstoffe) gebildet.

5. Ein gewisser Überschuß des basischen Farbstoffes, wie auch eine schwach alkalische Reaktion der Farblösung begünstigen die *Romanowsky*-Färbung.

6. Die Darstellung der azuophilen Substanzen ist auch mittels anderer als den gebräuchlichen Farbstofflösungen möglich.

---

### Literaturverzeichnis.

- <sup>1)</sup> *Abramow*, Atlas der pathogenen Mikroorganismen. Moskau 1917 (russ.). —
- <sup>2)</sup> *Adam*, Dtsch. med. Wochenschr. 1918, Nr. 36. — <sup>3)</sup> *Argutinsky*, Arch. f. mikroskop. Anat. **59**, 62. 1901. — <sup>4)</sup> *Becher*, Untersuchungen über Echtfärbung usw. Berlin 1921. — <sup>5)</sup> *Bernthsen*, Ber. d. dtsch. chem. Ges. **39**, 1804. 1906. — <sup>6)</sup> *Biltz*, Van Bemmelen Gedenkboek 1910, S. 108ff. (nach *Zsigmondy*, Kolloidchemie 1920, S. 319). Zeitschr. f. physikal. Chem. **68**, 357. 1909; **73**, 481. 1910; **77**, 91. 1911. —
- <sup>7)</sup> *Cretin*, Bull. et mém. de la soc. méd. des hôp. de Paris **36**, 1320. 1920. — <sup>8)</sup> *Epstein*, Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. I, Orig. **88**. 1922. — <sup>9)</sup> *Formanek*, Untersuchung und Nachweis organischer Farbstoffe auf

\*) Sie soll dem *Azurrot von Giemsa*<sup>12)</sup> entsprechen.

spektroskopischem Wege. I. Teil. 1908. — <sup>10)</sup> Giemsa, Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. I, Orig. **32**, 307. 1902. — <sup>11)</sup> Giemsa, ibid. **37**, 308. 1904. — <sup>12)</sup> Giemsa in Prowazeks Handbuch der pathogenen Protozoen. 1912. Artikel „Fixierung und Färbung“. — <sup>13)</sup> Giemsa, Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. I, Orig. 1922, 18. XI. — <sup>14)</sup> Hantzsch, Ber. d. dtsc. chem. Ges. **48**, 158. 1915. — <sup>15)</sup> Harris, Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. I, Orig. **34**, 188. 1903. — <sup>16)</sup> Herxheimer, Histologische Technik. 1921. Abderhaldens Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden, S. 41. — <sup>17)</sup> Kehrmann, Ber. d. dtsc. chem. Ges. **39**, 1403. 1906. — <sup>18)</sup> Kehrmann u. a., ibid. **46**, 2136. 1913. — <sup>19)</sup> Kehrmann u. a., ibid. **46**, 2803. 1913. — <sup>20)</sup> Kehrmann u. a., ibid. **47**, 1890. 1914. — <sup>21)</sup> Kehrmann u. a., ibid. **47**, 1892. 1914. — <sup>22)</sup> Kestner, Arch. f. Dermatol. u. Syphilis 1921, S. 472. — <sup>23)</sup> Kolhoff, Kolloid-Zeitschr. **30**, 35. 1922. — <sup>24)</sup> Krafft, Berlin. Ber. **32**, 1620. 1899. — <sup>25)</sup> Lee und Mayer, Grundzüge der mikroskopischen Technik. 1910. — <sup>26)</sup> Leishman, Brit. med. journ. Sept. 21, 1901. — <sup>27)</sup> Mallory und Wright, Pathological technique 1911. — <sup>28)</sup> Marino, Ann. de l'inst. Pasteur **18**, 167. 1904. — <sup>29)</sup> Martinotti, Zeitschr. f. wiss. Mikroskopie **26**, Heft 4. 1909. — <sup>30)</sup> May, Münch. med. Wochenschr. 1906, S. 358. — <sup>31)</sup> Michaelis, Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. I, Orig. **29**, 763. 1901. — <sup>32)</sup> Michaelis, Einführung in die Farbstoffchemie. 1902, S. 118 ff. — <sup>33)</sup> Michaelis, ibid., S. 142. — <sup>34)</sup> Michaelis, Virchows Arch. f. pathol. Anat. u. Physiol. **179**, 195. 1905. — <sup>35)</sup> Michaelis, Enzyklopädie der mikroskopischen Technik 1910. Artikel „Metachromasie“. — <sup>36)</sup> Michaelis (Pappenheim), Folia haematol. **13**, 187. 1912. — <sup>37)</sup> Michaelis, Biochem. Zeitschr. **97**, 57. 1919. — <sup>38)</sup> Michaelis, Arch. f. mikroskop. Anat. **94**. 1920. — <sup>39)</sup> Moschkowski, Autorreferate des VI. Allruss. Bakteriol.-Kongr. 1922, Heft 4, S. 17 (russ.). — <sup>40)</sup> Moschkowski, Arch. d. Russ. Protistologen-Ges. **2**, 302. 1923 (russ.). — <sup>41)</sup> Moschkowski, Eine einfache Methode zur Schnellfärbung usw. erscheint im Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. I, Orig. 1923. — <sup>42)</sup> Mukherjee, Philosoph. mag. **44**, Ser. 6, S. 321. 1922 (Literatur!). — <sup>43)</sup> Neisser, Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. I, Orig. **38**, Beiheft. 1906 (Ber. üb. d. Tagung d. fr. Vereinigung f. Mikrobiol.), S. 99. — <sup>44)</sup> Neumann, Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. I, Orig. 1907, Heft 7. — <sup>45)</sup> Nocht, ibid. **25**, 764. 1899. — <sup>46)</sup> Paneth und Horovitz, Physikal. Zeitschr. **15**, 924. 1914. — <sup>47)</sup> Pappenheim, Fol. haematol. **3**, 344. 1906. — <sup>48)</sup> Pappenheim, Med. Klinik 1908. — <sup>49)</sup> Pappenheim, Fol. haematol. **11**, 211. 1911. — <sup>50)</sup> Pappenheim, ibid. **12**, 326f. 1911. — <sup>51)</sup> Pappenheim, ibid. **13**, 187. 1912. — <sup>52)</sup> Pappenheim, Morphol. Hämatologie 1919, S. 29. — <sup>53)</sup> Pelet-Jolivet, Zeitschr. f. physikal. Chem. 1908, zitiert nach 54. — <sup>54)</sup> Prowazek, Zeitschr. f. wiss. Mikroskopie **31**, 1. 1914. — <sup>55)</sup> Pummerer und Gaßner, Ber. d. dtsc. chem. Ges. **46**, 2310. 1913. — <sup>56)</sup> Reuter, Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. I, Orig. **30**, 248. 1901. — <sup>57)</sup> Romanowsky, Zur Frage der Parasitologie und Therapie der Malaria. Diss. Petersburg 1891 (russ.). — <sup>58)</sup> Savatejev, Samml. Arbeit. zum Andenken Schatiłows. Charkow 1922 (russ.). — <sup>59)</sup> Scott, Thompson and Hydrick, Fol. haematol. **12**, 302. 1911. — <sup>60)</sup> Scott, ibid., S. 366. — <sup>61)</sup> Teague and Buxton, Zeitschr. f. physikal. Chem. **60**, 479. 1907. — <sup>62)</sup> Tribondeau, Ann. de l'inst. Pasteur **31**, 8. 1917. — <sup>63)</sup> Baudisch u. Unna, Dermatol. Wochenschr. **68**, 4—7. 1919. — <sup>64)</sup> Unna, Klin. Wochenschr. 1922. — <sup>65)</sup> Unna, Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. I, Orig. **88**, 159. 1922. — <sup>66)</sup> v. Wasielewski und Senn, Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. **33**. 1900.