

(Aus dem Pathologischen Institut der Universitäts-Frauenklinik Berlin [Vorstand: Professor Dr. *Robert Meyer*] und dem Chemischen Institut der landwirtschaftlichen Hochschule Berlin [Direktor: Professor Dr. *A. Binz*].)

## **Sind die in der histologischen Technik gebräuchlichen Fettdifferenzierungsmethoden spezifisch ? <sup>1)</sup>**

Von

**Carl Kaufmann und Erich Lehmann.**

*(Eingegangen am 28. Februar 1926.)*

In einer im Zentralbl. f. Pathol. 1926, Bd. 37 erschienenen Arbeit haben wir auszugsweise über Untersuchungen berichtet, die wir zur Klärung der Spezifitätsbreite der in der histologischen Technik gebräuchlichen Fettdifferenzierungsmethoden angestellt haben.

Nach einer Überprüfung und Erweiterung unserer Untersuchungen wollen wir erneut zu diesem Punkte Stellung nehmen.

Übersieht man den technischen Teil der über Fragen des Fettstoffwechsels in den letzten Jahren erschienenen reichen Literatur, so spielen die von uns angeschnittenen Gesichtspunkte eine etwas untergeordnete Rolle. Die Kritik der meisten Untersucher hat sich mit der Deutung der negativen Farbreaktion, der Frage des sogenannten unsichtbaren Fettes und der daraus zu ziehenden Schlüsse beschäftigt, unsere Untersuchungen beschäftigen sich mit der Deutung der positiven Farbreaktion, d. h. an einem Beispiel angeführt, wir haben uns gefragt, ob man aus dem *positiven* Ausfall der Fischlerschen Färbung mit Sicherheit auf die Anwesenheit von Fettsäuren schließen darf.

Die rein theoretisch chemische Deutung des Färbvorgangs, übertragen auf die Fettfärbung im Gewebsschnitt, erweckte unsere Bedenken, deren Berechtigung wir durch eine systematische Prüfung der in Frage stehenden Farbreaktionen am chemischen Reinsubstrat nachzuweisen versuchen.

*Kutschera-Aichbergen* hat den experimentellen Untersuchungen am Reinsubstrat jeglichen Wert abgesprochen. Dem ist entgegenzuhalten,

---

<sup>1)</sup> Die Untersuchungen sind mit Unterstützung der Notgemeinschaft deutscher Wissenschaft durchgeführt. — Besonderen Dank schulden wir Herrn Dr. *O. Rosenheim* (National Institut for Medical Research, London) für gütige Überlassung der analysierten Substanzen Sphingomyelin, Phrenosin und Kerasin.

daß in einer empirischen Wissenschaft der genaue Versuch das einzige Mittel ist, dem wirklichen Sachverhalt auf die Spur zu kommen. Auf dem Gebiet der histologischen Färbungen ist logischerweise kein anderer Weg gangbar als der, daß man die im Gewebsschnitt vorkommenden Stoffe auf ihr färberisches Verhalten zunächst in reiner Form untersucht. Danach erst gilt es, von der homogenen Einzelsubstanz zu den heterogensten Gemischen nach den Regeln der Kombinatorik fortzuschreiten und die Veränderungen der Färbungen Schritt für Schritt zu verfolgen. Nur so ist es möglich, sich allmählich an die verwickelten Verhältnisse der Wirklichkeit heranzutasten. Wollte man alle nach der Kombinatorik möglichen Fälle erschöpfen, so würde man eine unermeßliche Zahl von Einzelfällen verwirklichen müssen, die man aber nach Maßgabe der im Laufe der Untersuchungen sich einstellenden Regelmäßigkeiten auf ein erträgliches Maß einschränken kann.

Unsere Bedenken gehen von der Tatsache aus, daß es unter gewissen Bedingungen möglich ist, mit demselben Farbstoff die verschiedensten Materialien zu färben, Bedingungen, die von der chemischen Konstitution, der physikalischen Beschaffenheit des zu färbenden Objektes, von der Färbemethode und vom Charakter des verwendeten Farbstoffes abhängen. So zieht derselbe Farbstoff nicht nur auf Seide, tierische Wolle und Baumwolle mehr oder weniger „echt“ auf, sondern färbt auch Holz, Leder, Papier, Salze, Zucker, Paraffin, Fette, Metalle, ja selbst das chemisch so indifferente Glas. Ton und Stärke der Färbung werden dabei natürlich verschieden ausfallen, können aber auch bei mehreren dieser Stoffe gleich sein. Es können z. B. Cellulose, Fette, Paraffine als Vertreter verschiedener chemischer Gruppen durch denselben Farbstoff in gleicher Tönung und Stärke gefärbt werden, so daß man aus einem verwickelten Stoffgemisch das Vorhandensein eines bestimmten der drei genannten Stoffe nicht erschließen kann. Da im Gewebsschnitt nun eine ähnliche Vielheit von Substanzen vorliegt, ist es ohne weiteres gestattet, die für die Faserfärbung geltenden Anschauungen auf die Färbung im Gewebsschnitt zu übertragen. Das bedeutet aber, daß auch im Gewebsschnitt verschiedene Stoffe durch denselben Farbstoff gleich stark gefärbt werden können, ohne daß man zu entscheiden vermöchte, welcher bestimmte Stoff sich unter der Färbung verbirgt. Dazu kommt noch der besondere chemische Charakter des Zellgerüsts und des Zellinhaltes mit seinen zahlreichen Bestandteilen, nicht zuletzt auch der kolloidale Zustand, in dem sich die sichtbar zu machenden Stoffe befinden. Schon unter Berücksichtigung allein dieser Umstände erscheint es gewagt, eine Spezifität der Färbungen zu behaupten. Ebensowenig darf man aus scheinbar auftretenden Regelmäßigkeiten voreilige Schlüsse ziehen oder darauf analytische Nachweise begründen.

Die theoretische Deutung der Färbevorgänge bildet eins der meistumstrittenen Kapitel der gesamten Chemie, gerade weil die ungeheuere Verschiedenheit der zusammengebrachten Stoffe eine einheitliche Erklärung fast unmöglich macht. Jede der zahllosen Theorien umfaßt nur einen Teil von der Vielfalt der auftretenden Erscheinungen; sie sollen nur kurz erwähnt werden. Chemische und physikalische Theorien stehen einander schroff gegenüber. Die ältere chemische Theorie behauptet, daß die Farbstoffe gemäß ihrem sauren oder basischen Charakter beim Aufziehen auf Wolle oder Seide mit den Aminogruppen dieser eiweißartigen Stoffe oder mit deren Carbonylgruppen unter Salzbildung in Reaktion treten. Damit ist die relative Echtheit, die Haftfestigkeit auf der Faser hinreichend erklärt, jedoch versagt diese Theorie bei der Färbung von Baumwolle mit substantiven Farbstoffen der Benzidinreihe.

Die Chinontheorie nimmt an, da alle Farbstoffe chinoide Konstitution besäßen, daß der chinoide Komplex irgendeine der zahlreichen Kernkondensationen der Chinine mit den spezifischen Gruppen der Faser eingehe.

Die *Wernersche* Theorie sieht im gefärbten Stoff hochmolekulare Komplexverbindungen, die wie die komplizierten Einlagerungsverbindungen der anorganischen Chemie entstanden sein könnten.

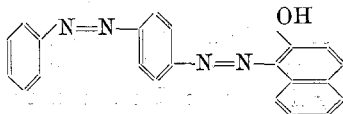
*Witt* faßt den gefärbten Stoff als eine feste Lösung auf.

Demgegenüber gehen die Verfechter der physikalischen Theorien vom Kolloidcharakter des Farbstoffs sowohl als auch der zu färbenden Stoffe aus und vertreten die Ansicht, daß der kolloidale Farbstoff innerhalb der Faser in ein festes Gel übergehe, das durch Lösungsmittel nicht mehr auswaschbar sei.

Die Vertreter der Adsorptionstheorie schließlich halten die Bindung des Farbstoffs an die Faser für einen einfachen Adsorptionsvorgang. Die Wirkung einer Metallbeize erklären sie als eine Adsorption der Beizmittel, das sind hydrolysierbare Salze, an das Gewebe. Beim nachfolgenden Ausfärben soll dann der Farbstoff seinerseits unter Lackbildung von dem durch Hydrolyse entstandenen Metallhydroxyd adsorbiert werden.

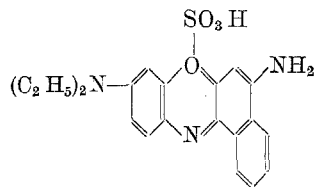
Es soll nunmehr mit Hilfe dieser Theorien versucht werden, die in der Histologie gebräuchlichsten Fettfärbeverfahren in ihrem Chemismus zu erklären.

1. Am einfachsten liegen die Verhältnisse beim Sudan, das in die Klasse der Diazofarbstoffe gehört, Baumwolle direkt (ohne Beize) granatrot färbt und folgende Struktur besitzt:



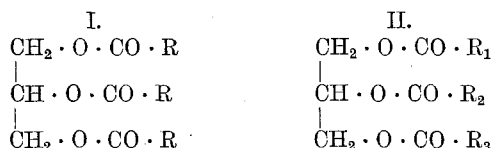
Der Farbstoff ist in Alkohol und Fetten mit roter Farbe löslich. Daher ist die Färbbarkeit von Fettstoffen mit Sudan als einfacher Lösungsvorgang am wahrscheinlichsten. Selbstverständlich ist Sudan nicht in allen im Gewebe vorkommenden Fetten und fettähnlichen Stoffen im gleichen Maße löslich, so daß unter gewissen Umständen die Löslichkeit so herabgedrückt werden kann, daß gar keine Färbung eintritt, obwohl dennoch Fett in reichlicher Menge vorhanden sein kann und durch andere Mittel einwandfrei nachweisbar ist. Ein besonderer Umstand, der auch in unseren Sudanfärbungen häufig zutage trat, verdient erhöhte Beachtung, nämlich die Erscheinung der Löslichkeitserhöhung. Darunter ist die Erscheinung zu verstehen, daß ein Stoff, der an und für sich in einem Lösungsmittel (z. B. Alkohol) schwer löslich ist, durch Hinzukommen eines andern, leichter löslichen Stoffes nun in höherem Maße in Lösung geht als seiner vorherigen Löslichkeit entspricht. Beim Arbeiten mit der gebräuchlichen 70 proz. alkoholischen Sudanlösung zeigten sich an Reinsubstanzen ausgezeichnete Färbungen, in Mischungen dagegen versagte die Färbung sehr oft. Wurde aber Sudan in nur 40 proz. alkoholischer Lösung angewandt, so ergaben dieselben Mischungen positiven Ausfall der Färbungen. Das ist nur so zu erklären, daß der hochprozentige Alkohol das Fettgemisch rascher und leichter löst als den reinen Fettstoff. Daß es sich tatsächlich um eine Auflösung der Fettgemische handelt, geht daraus hervor, daß das mit 70 proz. alkoholischen Sudan ungefärbt bleibende Präparat auch bei Nachfärbung mit 40 proz. Sudan keine Reaktion gibt. Wird die Färbung sofort mit 40 proz. alkoholischem Sudan vorgenommen, so weist dieselbe Mischung stark positive Reaktion auf. Daraus ist zu ersehen, daß die Löslichkeitsverhältnisse für den Ausfall der Färbungen eine hervorragende Rolle spielen, sowohl die Erhöhung als auch die Verminderung der Löslichkeit. Dieser Tatsache ist von anderer Seite bisher noch keine Beachtung geschenkt worden. Man muß also sagen, daß bei positiver Sudanreaktion Fett irgendwelcher Art vorliegt; bei negativer Reaktion aber darf man keinesfalls auf Abwesenheit von Fettstoffen schließen.

2. Nilblau zählt zu den Oxazinfarbstoffen; ihm kommt folgende Konstitution zu:



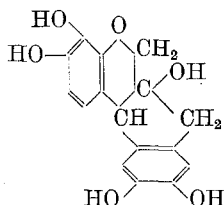
Es färbt tierische Faser nicht dauerhaft, sehr gut aber tannierte Baumwolle. Im Gewebsschnitt soll es Fettester leuchtend rot, Fettsäuren dunkelblau färben. Bei unseren Untersuchungen an ungemischten

Reinsubstanzen fanden wir das Ergebnis von *Boeminghaus* bestätigt, daß der Träger der blauen Farbreaktion die Ölsäure bzw. andere ungesättigte Fettsäuren sind, so daß man die Lückenbindung dieser Säuren für das Auftreten der Blaufärbung verantwortlich machen muß, denn gesättigte Säuren geben nur in zwei Ausnahmefällen diese Reaktion. Die Stärke der Blaufärbung scheint mit der Anzahl der Lückenbindungen bzw. der Zunahme des ungesättigten Charakters zuzunehmen, wenngleich auch hier Ausnahmen stattfinden, denn wir fanden starke Blaufärbung auch bei Mischungen, die keine Ölsäure oder eine andere ungesättigte Säure enthielten. Dasselbe gilt für die Rotfärbung von Neutralfetten. Nur Triolein als ungesättigte Verbindung nimmt einen rosafarbenen Ton an, gesättigte Triglyceride dagegen nicht. In welcher Weise vom chemischen Standpunkt aus die Lückenbindung mit der Färbbarkeit in Zusammenhang gebracht werden kann, bleibt vorläufig der Einsicht verborgen, da experimentelle Untersuchungen in dieser Richtung bisher nicht angestellt worden sind. Nun muß betont werden, daß man es in Geweben niemals mit einfachen Triglyceriden vom Typus I, der drei gleiche, entweder gesättigte oder ungesättigte Radikale (R) enthält, zu tun hat, sondern stets mit gemischten Glycerinestern vom Typus II, worin eins oder zwei der mit  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$



bezeichneten Radikale ungesättigten Charakter haben können. Wenn auch nur eins dieser Radikale ungesättigt ist, wird mit Nilblau Rosafärbung eintreten wie beim Triolein. Das beweisen auch die Ergebnisse der von uns an natürlichen Fetten ausgeführten Färbungen; sie sind in allen Fällen positiv. Daher muß man der Rosafärbung der Neutralfette mit Nilblau Spezifität zuerkennen, wenn man noch berücksichtigt, daß eine eventuell erscheinende Dunkelblaufärbung die Rosafärbung überdeckt.

3. Die Färbung nach *Fischler* mit Kupferacetat und Hämatoxylin besteht in einer Farblackbildung. Hämatoxylin gehört zufolge seiner Konstitution in die Klasse der Flavonfarbstoffe:



Es färbt sich mit Säuren purpurrot, mit Alkalien entsteht eine blau-violette kolloidale Lösung, mit Alkalicarbonat tritt gleichfalls Dunkelrotfärbung ein. Hämatoxylin und Kupferacetat geben zusammengebracht eine voluminöse, schwarzviolette Färbung, die mit Alkalicarbonat in Blauschwarz übergeht. Die Färbung der Fettsäuren ist also so zu verstehen, daß das schwach hydrolysierte Kupferacetat zunächst einen geringen Teil seines Kupfers an die Fettsäuren unter Bildung der entsprechenden Kupfersalze abgibt und sich selbst dabei in basisches Kupferacetat,  $\text{Cu}(\text{OH})\text{OOCCH}_3$  umwandelt. Dieses unlösliche Carbonat schlägt sich dann auf die Fettstoffe nieder. Wird jetzt das unverbrauchte neutrale Kupferacetat durch Auswaschen entfernt und der zu färbende Schnitt mit der Hämatoxylinlösung versetzt, so bildet sich genau derselbe Kupferfarblack, wie er auch beim Zusammenbringen der reinen Agentien entsteht, der dann unter der Einwirkung von Lithiumcarbonat unter Oxydation durch Luftsauerstoff in Blauschwarz übergeht. Nun sind nicht allein die Carboxylgruppen befähigt Kupfersalze zu bilden, sondern alle, wenn auch noch so schwach sauer reagierende Gruppen ( $\text{OH}$ ,  $\text{NOH}$  usw.). Es sei ferner daran erinnert, wie sehr gerade Kupfer zu Komplexsalzbildung neigt, so daß leicht verwickelte Einlagerungsverbindungen entstehen können. Alle diese Überlegungen führen zu dem Schluß, daß eine Spezifität der Kupferhämatoxylinfärbung sehr zweifelhaft erscheint.

4. Die Methode von *Smith-Dietrich* zur Sichtbarmachung der sogenannten Lipide mit Hämatoxylin und Kaliumbichromat in essigsaurer Lösung bei  $37^\circ$  könnte den Anspruch der Spezifität damit begründen, daß die Phosphatide und Cerebroside verhältnismäßig unbeständige Stoffe seien, und daß sie bei der Behandlung mit Oxydationsmitteln oxydativen Veränderungen anheimfallen könnten. Die Spaltstücke müßten dann ihrerseits zur Chromlackbildung mit dem Farbstoff befähigt sein. Es könnte z. B. Verseifung zu Stearinsäure, Ölsäure und Glycerinphosphorsäure eintreten, in welche Bestandteile das Lecithin bei energischer Verseifung mit Alkalien zerfällt. Das ist aber höchst unwahrscheinlich, da das Lecithin selbst von Mineralsäuren nur sehr langsam angegriffen wird. Wir haben eine wässrige Suspension von Lecithin mehrere Tage mit Kaliumbichromat in neutraler wie auch in essigsaurer Lösung stehenlassen, ohne daß eine andere Einwirkung bemerkbar gewesen wäre als die Ausflockung des Kolloids. Eine oxydative Veränderung hätte sich in der Verfärbung des roten Bichromats kundtun müssen. Erst nach einwöchigem Stehen zeigte die essigsaurer Kaliumbichromat-Lecithinsuspension einen Stich ins Grüne, ein Zeichen, daß Oxydation eingetreten war. Beim Erhitzen bis fast zum Sieden zerfällt das Lecithinmolekül aber sehr rasch. Daraus geht hervor, daß Lecithin gegen Oxydationswirkungen zum mindesten bei gewöhnlicher

Temperatur verhältnismäßig beständig ist. Anders liegen die Dinge, wenn man die Färbung bei 60° ausführt. Bei dieser Temperatur beginnt bereits die Zersetzung der Phosphatide und Cerebroside, und die Begründung der Spezifität dieser Reaktion mit der Unbeständigkeit der sogenannten Lipoide wäre richtig, wenn nicht bei 60° in höherem Maße die Gefahr bestände, daß auch andere Stoffe oxydativ angegriffen werden könnten. Bei 37° und noch leichter bei 60° könnten alle Stoffe mit Lückenbindungen Spaltungen erleiden, z. B. Cholesterin, Ölsäure usw. Ferner könnten Hydroxylgruppen oder auch andere Gruppen oxydiert werden und positiven Ausfall der Färbung verursachen.

Man könnte ferner die Spezifität der Smith-Dietrichschen Färbung auf den Kolloidcharakter und damit auf das hohe Adsorptionsvermögen der sogenannten Lipoide zurückführen. Bedenkt man aber, daß sich im Gewebe fast alle Stoffe im Kolloidzustand befinden, so wird dieser Einwand hinfällig.

Hämatoxylin selbst gibt mit Kaliumbichromat sowohl in neutraler als auch in essigsaurer Lösung unter Oxydation des Farbstoffes einen schwarzbraunen Farblack, der im Gewebsschnitt natürlich überall da festhaftet, wo Kaliumbichromat adsorbiert worden ist, oder wo es während der Beizung oxydierend eingewirkt hat.

Beim histochemischen Fettnachweis kommt es besonders auf die Stärke der Färbungen an; eine matte Färbung wird allgemein als negativ gewertet. Die Abstufung der Farbstärke soll durch die sogenannte Differenzierung, die Nachbehandlung des gefärbten Schnittes mit bestimmten chemischen Agentien, erreicht werden. Darüber ist im einzelnen folgendes zu sagen: Bei der Nilblaufärbung wird der hängen-gebliebene Farbstoff, der vom Gewebe nur locker adsorbiert worden ist, sich durch Wasser allein aber nicht auswaschen läßt, durch die schwach saure Wirkung der Essigsäure in Lösung gebracht. An den Stellen, wo er eine festere Bindung eingegangen ist, bleibt er aber haften. Bei den Hämatoxylinfärbungen wird der im ganzen Schnitt mechanisch umhergeschwemmte Farbstoff infolge der schwachen Alkalität und der gelinden Oxydationswirkung der Borax-Ferricyan-kaliumlösung löslich gemacht, und nur der Farblack selbst ist gegen diese gelinde Einwirkung unempfindlich.

5. Die Cholesterinreaktion nach *Schultz* mit Eisenalaun, Eisessig und konzentrierter Schwefelsäure stellt einen rein chemischen Vorgang dar, dessen Reaktionsverlauf von *Schultz* selbst verständlich gemacht worden ist. Es handelt sich nach *Schultz* um eine Oxydation des Cholesterins zum Oxycholesterin unter Wirkung des Eisenalauns, so daß also das Oxycholesterin Träger der blaugrünen Farbe ist. Bei Anwesenheit von Stoffen, die diese Oxydation verhindern, bleibt natürlich die Färbung aus. *Schultz* selbst muß am Schluß seiner Arbeit zugeben:

„Der negative Ausfall freilich darf nicht dazu verleiten, die Anwesenheit von Cholesterin gänzlich auszuschließen.“

Zur Handhabung des Färbens bleibt noch hervorzuheben, daß das Arbeiten in Alkohol oder anderen fettlösenden Medien immer die Gefahr mit sich bringt, daß das Fett infolge der feinen Verteilung aus dem Schnitt rasch herausgelöst wird. Auf jeden Fall ist das Hin- und Herbewegen der Schnitte mit der Pinzette auch in den Spülbädern unbedingt zu vermeiden, weil dadurch die im Gewebe nur lose hängenden Stoffe mechanisch ausgeschleudert werden, so daß sich unter dem Mikroskop leicht ein entstelltes Bild darbieten kann. Man läßt tunlichst den Schnitt im Färb- oder Spülbade ruhig liegen und den Farbstoff langsam sich niederschlagen, bzw. in den Spülbädern für Beize sowohl wie für Farbstoff langsam herausdiffundieren. Nur dann kann man bei Anwendung der von uns weiter unten angegebenen Arbeitsweise gute, einwandfreie Ergebnisse erzielen.

Es sei nun eine Systematik der von uns untersuchten Stoffe gegeben unter Berücksichtigung des durch die besondere Atomgruppierung bedingten chemischen Charakters der einzelnen Verbindungen. Diese Aufstellung soll dazu dienen, die große Verschiedenartigkeit der als Fette bezeichneten Stoffe zu veranschaulichen und klar vor Augen zu führen, was alles mit dem Namen „Lipoid“ bezeichnet wird. Die chemische Systematik kann nicht zulassen, daß Stoffe, die nur noch die Löslichkeit in Pyridin oder die Unlöslichkeit in Wasser als gemeinsames Merkmal aufweisen, mit gleichem Namen benannt und in dieselbe Körperklasse gesetzt werden, obwohl ihre chemische Konstitution nicht die geringste Ähnlichkeit hat. Der Begriff „Lipoid“ hat keinen chemischen Sinn und ist deshalb fallen zu lassen. Jeder Vertreter einer neuen Gruppe kann beim Hinzukommen zu Fettgemisch die Färbung in eigener Weise beeinflussen. Selbst innerhalb einer homologen Reihe, z. B. der der gesättigten Fettsäuren, sind Eigentümlichkeiten und Ausnahmen vorhanden.

An erster Stelle stehen die Fettsäuren, chemisch ausgezeichnet durch die Carboxylgruppe, an die die Acidität gebunden ist. Innerhalb dieser Körperklasse bringen der Sättigungsgrad der Säuren, also die Lückenbindung, sowie die Oxygruppe neue chemische Besonderheiten im Verhalten mit sich. In der zweiten Gruppe der Fettester sind Glycerinester von Cholesterinestern und von natürlichen Fetten zu trennen, da Glycerin und Cholesterin, obwohl beides Alkohole, wesentlich verschiedene Stoffe sind; die natürlichen Fette vollends stellen ein verwirrendes Gemenge von zahlreichen Estern und chemischen Verbindungen dar. Die dritte Gruppe enthält die Alkohole, deren Verschiedenheit soeben erwähnt worden ist. Zur vierten Gruppe gehören die Phosphatide, von denen das Sphingomyelin vor dem Lecithin dadurch



gekennzeichnet ist, daß es in seinem komplizierten Molekül außer den im Lecithin enthaltenen Bausteinen noch Lignozerinsäure und Sphingosin enthält. Die Stoffe der fünften Gruppe sind mit den Phosphatiden nicht in dieselbe Klasse zu rücken, denn sie sind Glucoside, enthalten also Zucker und keinen Phosphor.

## I. Carbonsäuren.

### a) Gesättigte Säuren.

Propionsäure	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COOH}$	Fp. $36,5^\circ$	Sdp. $140^\circ$
Buttersäure	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$	Fp. $8^\circ$	Sdp. $163^\circ$
Valeriansäure	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$	Fp. $18^\circ$	Sdp. $186^\circ$
Capronsäure	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$	Fp. $2^\circ$	Sdp. $205^\circ$
Laurinsäure	$\text{C}_{11}\text{H}_{23}\text{COOH}$	Fp. $43,5^\circ$	Sdp. $10-11$ $166^\circ$
Myristinsäure	$\text{C}_{13}\text{H}_{27}\text{COOH}$	Fp. $53,5^\circ$	Sdp. $15$ $197^\circ$
Palmitinsäure	$\text{C}_{15}\text{H}_{31}\text{COOH}$	Fp. $62^\circ$	Sdp. $15$ $215^\circ$
Stearinsäure	$\text{C}_{17}\text{H}_{35}\text{COOH}$	Fp. $69^\circ$	Sdp. $15$ $232^\circ$
Cerotinsäure	$\text{C}_{25}\text{H}_{51}\text{COOH}$	Fp. $78^\circ$	

### b) Ungesättigte Säuren.

#### $\alpha$ ) Olefincarbonsäuren.

Crotonsäure	$\text{CH}_3\text{CH}=\text{CH} \cdot \text{COOH}$	Fp. $72^\circ$	Sdp. $1890^\circ$
Ölsäure	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7 \cdot \text{COOH}$	Fp. $14^\circ$	Sdp. $15$ $233^\circ$

#### $\beta$ ) Acetylen-carbonsäuren.

Stearolsäure	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{C}=\text{C} \cdot (\text{CH}_2)_7 \cdot \text{COOH}$	Fp. $48^\circ$	
--------------	---	----------------	--

#### $\gamma$ ) Diolefincarbonsäuren.

Sorbinsäure	$\text{CH}_3\text{CH}=\text{CH} \cdot \text{CH}=\text{CH} \cdot \text{COOH}$	Fp. $135^\circ$	Sdp. $228^\circ$
Linolsäure	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CH} \cdot \text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7 \cdot \text{COOH}$		Sdp. $14$ $228^\circ$

### c) Oxy-carbonsäuren.

#### $\alpha$ ) Gesättigte.

Glykolsäure	$\text{CH}_2(\text{OH}) \cdot \text{COOH}$	Fp. $78-79^\circ$	
Milchsäure (d + l)	$\text{CH}_3 \cdot \text{CH}(\text{OH}) \cdot \text{COOH}$	Fp. $18^\circ$	Sdp. $12$ $119^\circ$

#### $\beta$ ) Ungesättigte.

Ricinolsäure	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7 \cdot \text{COOH}$	Fp. $4-5^\circ$	Sdp. $15$ $250^\circ$
--------------	---	-----------------	-----------------------

## II. Fettsäureester.

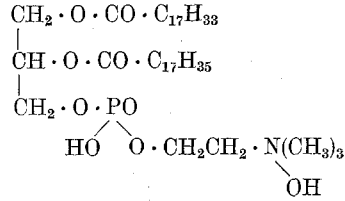
### a) Gesättigte.

Tripalmitin	$\text{CH}_2 \cdot \text{O} \cdot \text{CO} \cdot \text{C}_{15}\text{H}_{31}$	Fp. $69^\circ$
	$\mid$ $\text{CH} \cdot \text{O} \cdot \text{C} \text{O} \cdot \text{C}_{15} \cdot \text{H}_{31}$	
	$\mid$ $\text{CH}_2 \cdot \text{O} \cdot \text{COC}_{15}\text{H}_{31}$	



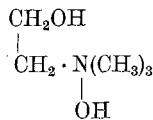
#### IV. Phosphatide.

a) Lecithin



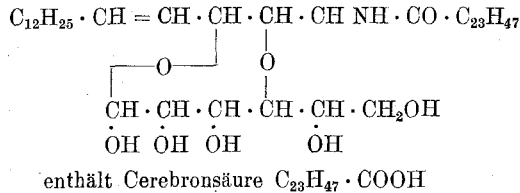
b) Sphingomyelin [Konstitution noch nicht geklärt] enthält: Phosphorsäure, Lignozersäure  $C_{23}H_{47} \cdot CH(OH)COOH$

Cholin

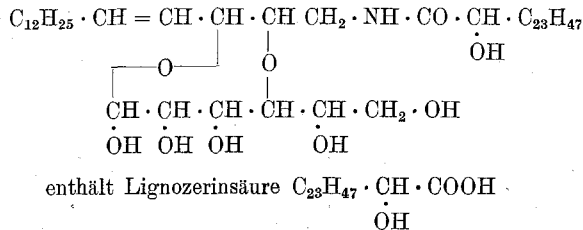

$$\text{Sphingosin } \text{C}_{12}\text{H}_{25} \cdot \text{CH} = \text{CH} \cdot \text{CH}(\text{OH}) \cdot \text{CH}(\text{OH}) \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{NH}_2$$

### V. Cerebroside.

a) Kerasin



b) Phrenosin



Über die von uns angewandte Technik ist folgendes zu bemerken.

Um unter gleichen technischen Bedingungen wie bei Gewebsschnittuntersuchungen zu arbeiten, haben wir poröses, chemisch indifferentes Material im Vakuum möglichst weitgehend von Luft befreit, durch Aufheben des Unterdrucks die Poren mit der umgebenden Flüssigkeit sich vollsaugen lassen und Gefrierschnitte hergestellt. Das geeignetste Material für diesen Zweck schien uns das Holundermark zu sein. Wir haben nicht versäumt, das leere Mark zur Entfernung evtl. vorhandener Fettstoffe vor dem Gebrauch mit Äther 12 Stunden lang im Soxhlet zu extrahieren und auf seine Färbbarkeit mit den oben erwähnten Farbstoffen zu prüfen. Das von Fett freie Holundermark gibt mit Sudan keine Färbung; mit Nilblau wird es himmelblau; nach Fischler-Färbung behält es einen blaßgrauen Ton; nach Smith-Dietrich-Färbung bleibt es farblos. Am fettbeschickten Holunder-

schnitt läßt sich das Gerüstnetz des Markes genau von der meist tropfenförmig eingelagerten Fettsubstanz unterscheiden. Bei Nilblaufärbung hebt sich das dunkelblau gefärbte Fett scharf vom hellblauen Ton der Gittersubstanz des Markes ab, eine Täuschung ist unmöglich. Ebenso deutlich unterscheidet sich das schwarzgefärbte Fett vom Hellgrau des Maschenwerkes bei der Fischler-Färbung.

Im einzelnen geschah die Füllung des Holundermarkes mit den unter 100° schmelzenden, bei gewöhnlicher Temperatur aber festen Stoffen und deren verschiedenen Mischungen in der Weise, daß die betreffenden Stoffe in einer Petrischale geschmolzen wurden. In die Flüssigkeit wurden 2—3 cm lange Stücke Holundermark gelegt und, um sie zum Untertauchen zu bringen, mit mehreren Glasplatten beschwert. Nach dem Erkalten und Erstarren der Schmelze wurde das Schälchen in eine in der chemischen Praxis gebräuchliche Trockenpistole größten Kalibers geschoben und bei der Siedetemperatur des Wassers so lange evakuiert, bis aus dem Holundermark nur noch wenige Luftbläschen in die wieder geschmolzene Masse austraten. Danach wurde das Vakuum aufgehoben, erkalten gelassen, der Inhalt des Schälchens wieder geschmolzen, das Mark herausgeholt und mit sauberem Filtrierpapier abgetrocknet.

Bei den hochschmelzenden Stoffen, wie Cholesterin, und bei den unter Zersetzung schmelzenden, wie Lecithin, ist diese Methode nicht anwendbar. In diesen Fällen verfährt man so, daß man durch Lösen der betreffenden Substanz in geeigneten Lösungsmitteln (Äther, Alkohol, Pyridin) und Zusammengießen der einzelnen Lösungen in einer Petrischale die gewünschten Mischungen herstellt.

Setzt man das wiederum mit Holunderstückchen und Glasplatten beschickte Schälchen in einen Vakuumexsiccator und evakuiert, so bekommt man trotz der leichten Flüchtigkeit der Lösungsmittel doch soviel Luft aus dem Holundermark heraus, daß nach Wiederherstellung des gewöhnlichen Druckes hinreichend viel Fettlösung in die Poren des Markes hineingepreßt wird. Nach kurzem Stehen wird das Holundermark herausgenommen, abgetrocknet und, falls Alkohol oder Äther benutzt wurden, diese Lösungsmittel an der Luft verdunsten gelassen, falls Pyridin gebraucht wurde, dieses im Vakuum abgesaugt. Die gelösten Stoffe bleiben, da sie nicht flüchtig sind, in den Maschen des Markes zurück.

Besondere Schwierigkeiten machte die Herstellung von Mischungen mit wässriger Eiweißlösung, da alle Fette in Wasser praktisch unlöslich sind. Ein Ausweg bot sich in der Eigenschaft vieler Fettstoffe, mit Wasser leicht haltbare Suspensionen zu bilden. Wir haben daher die verschiedenen Eiweißfettgemische durch andauerndes Schütteln in Wasser suspendiert und diese Suspensionen zum Aufsaugen in Holundermark verwendet. Dies Verfahren hat nur in dem Falle der Mischung von Cholesterin mit Eiweißlösung versagt. Das Entfernen des Wassers aus dem gefüllten Holundermark erfolgte auch hier durch Trocknen im Vakuumexsiccator.

In den jetzt folgenden Tabellen finden sich entsprechend der oben angeführten chemischen Gruppierung unsere Versuchsergebnisse.

Bei der Sudanfärbung haben wir stets den ganzen Färbvorgang an einem Schnitt unter dem Mikroskop beobachtet und die lösende Wirkung der alkoholischen Lösung bei bestimmten Fettstoffen festgestellt.

Tabelle 1. *Gesättigte Fettsäuren.*

	Sudan	Nilblau	Fischler	Smith-Dietrich bei 37 u. 60°
Buttersäure	Entzieht sich der histologischen Färbung			
Valeriansäure	Färbung u. d. Mikroskop goldgelb	Entzieht sich der histologischen Färbung		
Capronsäure	Färbung u. d. Mikroskop goldgelb	Blauschwarz	Ungefärbt	Ungefärbt
Laurinsäure	70% ungefärbt, in 40proz. alkohol. Lösung goldgelb	Schwachviolett	Schwarz	"
Myristinsäure	Löst sich in 70proz. alkohol. Lösung auf. Färbg. unter d. Mikroskop goldgelb	Ungefärbt	"	Braungrau bei 37°, ungefärbt bei 60°
Palmitinsäure	Ungefärbt	"	"	Ungefärbt
Stearinsäure	"	"	"	"
Cerotinsäure	Gelb	"	Ungefärbt	"
Glykolsäure	Entzieht sich der histologischen Färbung			
Milchsäure	"	"	"	"

Tabelle 2. *Ungesättigte Fettsäuren.*

	Sudan	Nilblau	Fischler	Smith-Dietrich bei 37 u. 60°
Crotonsäure	Unter dem Mikroskop goldgelb	Dunkelblau	—	Ungefärbt
Ölsäure	Goldgelb	"	Schwarz	"
Stearolsäure	Goldgelb, wird fast völlig in d. 70proz. alkohol. Lösung aufgelöst	Färbg. unter dem Mikroskop blauschwarz	"	"
Linolensäure	Goldgelb	Schwarz	"	"
Sorbinsäure	Geringer Teil goldgelb, der größte Teil ungefärbt	Ungefärbt	"	"
Ricinolsäure	Goldgelb	Dunkelblau	"	"

Tabelle 3. *Neutralfette, Triglyceride und natürliche Fette.*

	Sudan	Nilblau	Fischler	Smith-Dietrich bei 37 u. 60°
Tripalmitin	Goldgelb	Ungefärbt	Ungefärbt	Ungefärbt
Tristearin	Mattes Graugelb	"	"	"
Triolein	Goldgelb	Rosarot	"	"
Butter	"	Rosa	Schwarz	"
Schweinefett	"	"	Grauschwarz	"
Rindertalg	"	"	Ungefärbt	"
Menschenfett	"	"	Schwarz	"
Menschenfett u. Cholesterin	"	"	Blaugrau	"

Tabelle 4. *Triglyceride mit gesättigten und ungesättigten Fettsäuren.*

	Sudan	Nilblau	Fischler	Smith-Dietrich bei 37 u. 60°
Tripalmitin und Palmitinsäure	Goldgelb	Ungefärbt	Ungefärbt	Ungefärbt
Tripalmitin u. Stearinsäure	"	"	Schwarz	"
Tripalmitin und Ölsäure	70 % ungefärbt, 40 % goldgelb	Dunkelblau	"	"
Tristearin und Palmitinsäure	Goldgelb	Ungefärbt	z. T. schwarz	"
Tristearin u. Stearinsäure	"	"	Ungefärbt	"
Tristearin u. Ölsäure	"	Dunkelblau	Schwarz	"
Triolein u. Palmitinsäure	"	Rosarot (Farbton blaßt sehr bald ab!)	"	"
Triolein u. Stearinsäure	"	Rosarot	"	"
Triolein u. Ölsäure	"	Blau	"	"

Tabelle 5. *Cholesterin rein und in Verbindung mit Fettsäuren und Triglyceriden.*

	Sudan	Nilblau	Fischler	Smith-Dietrich bei 37 und 60°	Schultze'sche Reaktion
Cholesterin	Goldgelb	Ungefärbt	Ungefärbt	Ungefärbt	Grün
Cholesterin und Palmitinsäure	Schwach gelb	"	Schwarz (diffus)	"	"
Cholesterin u. Stearinsäure	" "	"	" "	"	Andeutung von Grün
Cholesterin und Ölsäure	70proz. alkohol. Lösung wenig gefärbt., goldgelb. In 40% reichl. Fett, goldgelb	Dunkelblau	Graublau	Bei 60° graublaue Tropfen	Blaugrün
Cholesterin und Tristearin	Goldgelb	Ungefärbt	Ungefärbt	Ungefärbt	Violett
Cholesterin und Tripalmitin	"	"	"	Bei 60° grau, keine Lipoidreaktion	Blau
Cholesterin und Triolein	"	Dunkelblau	Schwarz	Bei 60° blaugrau	Ungefärbt
Cholesterin und Tripalmitin und Palmitinsäure	"	Ungefärbt	Ungefärbt	Bei 60° graublau	Blaugrün
Cholesterin u. Palmitinsäure u. Tristearin	"	"	Ungefärbt (Fett vorhanden)	Bei 60° graublau	"

Tabelle 5 (Fortsetzung).

	Sudan	Nilblau	Fischler	Smith-Dietrich bei 37 und 60°	Schultze'sche Reaktion
Cholesterin und Triolein u. Palmitinsäure	Goldgelb	Rosa	Schwarz	Bei 60° helles blaugrau	Blaugrün
Cholesterin u. Stearinsäure und Tripalmitin	"	Ungefärbt	"	Bei 60° blaugrau (deutl. Tropfen)	Grün
Cholesterin u. Stearinsäure und Tristearin	"	"	Grau m. schwarzen Einlagerungen	Ungefärbt	Blaugrün
Cholesterin u. Stearinsäure und Triolein	"	Rosarot	Graublau	Bei 60° graublau	Ungefärbt
Cholesterin und Ölsäure und Tripalmitin	"	Dunkelblau	Schwarz	Ungefärbt	Blaugrün
Cholesterin und Ölsäure und Tristearin	"	Blau	"	Bei 60° blaugrau	Blau
Cholesterin und Ölsäure u. Triolein	"	"	"	Bei 60° blaugrau, stellenweise tiefblaue bis schwarze Tropfen	Grün

Tabelle 6. *Lecithin rein und in Verbindung mit Fettsäuren und Triglyceriden.*

	Sudan	Nilblau	Fischler	Smith-Dietrich bei 37 und 60°
Lecithin in wässriger Suspension	Goldgelb	Ungefärbt	Ungefärbt	Ungefärbt
Lecithin Merk	"	"	"	Gelbbraun
Lecithin Kahlbaum	"	"	"	Bei 37° gelbbraun, bei 60° dunkelbraun, stellenweise schwarz
Lecithin und Palmitinsäure	"	"	Schwarz	Bei 37° hellbraun, bei 60° schwarzgrau
Lecithin u. Stearinsäure	"	"	"	Bei 37° braun, keine Lipoidreaktion, bei 60° z. T. braun, z. T. grauschwarz
Lecithin u. Ölsäure	"	Blau	"	Bei 37° graublau, bei 60° schwarz
Lecithin und Tripalmitin	"	Ungefärbt	"	Bei 37° ungefärbt (hellgelb), bei 60° braun, z. T. schwarz
Lecithin und Tristearin	"	"	Ungefärbt	Bei 37° braun, bei 60° hellbraun
Lecithin u. Triolein	"	Rosa, bläßt bald ab	Schwarz	Bei 37° braun, z. T. schwarzgrau, bei 60° dklbr., z. T. schwarz

Tabelle 6 (Fortsetzung).

	Sudan	Nilblau	Fischler	Smith-Dietrich bei 37 und 60°
Lecithin und Palmitinsäure und Tripalmitin	Goldgelb	Ungefärbt	Schwarz	Bei 37° ungefärbt (hellgelb), bei 60° schwarz
Lecithin und Palmitinsäure und Tristearin	"	"	Blaugrauschwarz	Bei 37° ungefärbt, bei 60° schwarz
Lecithin und Palmitinsäure und Triolein	"	Tiefblau	Schwarz	Bei 37° graublau, meist ungefärbt, bei 60° tief-schwarz
Lecithin u. Stearinsäure und Tripalmitin	"	Ungefärbt	"	Bei 37° ungefärbt, bei 60° braun
Lecithin u. Stearinsäure u. Tristearin	"	"	Graublau	Bei 37° ungefärbt, bei 60° braun mit schwarz
Lecithin u. Stearinsäure u. Triolein	"	Blau	"	Bei 37° hell graublau, bei 60° schwarz
Lecithin u. Ölsäure und Tripalmitin	"	Dunkelblau	Schwarz	Bei 37° graublau, bei 60° schwarz
Lecithin u. Ölsäure und Tristearin	"	"	"	Bei 37° ungefärbt, bei 60° schwarz
Lecithin u. Ölsäure und Triolein	"	Blau	"	Bei 37° ungefärbt, bei 60° schwarz

Tabelle 7.

*Sphingomyelin rein und in Mischungen mit Ölsäure, Triolein, Cholesterin und Lecithin.*

	Sudan	Nilblau	Fischler	Smith-Dietrich bei 37 und 60°	Schultze'sche Reaktion
Sphingomyelin	U. d. M. 70% goldgelb, 40% goldgelb, 70%	Ungefärbt	Ungefärbt	Bei 37° ungefärbt, bei 60° schwarz	Negativ
Sphingomyelin u. Ölsäure	Goldgelb	Dunkelbl.	Schwarz	Bei 37° ungefärbt, bei 60° schwarz	"
Sphingomyelin und Triolein	U. d. M. 70% goldgelb, 40% goldgelb	Rosa	"	Bei 37° schwarz, bei 60° schwarz	"
Sphingomyelin und Cholesterin	U. d. M. 70% goldgelb, 40% ungefärbt	Ungefärbt	Schwarz	Bei 37° ungefärbt, bei 60° schwarz	Grün
Sphingomyelin und Lecithin	U. d. M. 70% goldgelb, 40% goldgelb	"	"	Bei 37° ungefärbt, bei 60° braun	Negativ
Sphingomyelin und Ölsäure u. Triolein	U. d. M. goldgelb, 40% goldgelb	Dunkelbl.	"	Bei 37° ungefärbt, bei 60° schwarz	"
Sphingomyelin und Ölsäure und Cholesterin	U. d. M. goldgelb, 40% goldgelb	"	"	Bei 37° graublau, bei 60° schwarz	Grün



Tabelle 7 (Fortsetzung).

	Sudan	Nilblau	Fischler	Smith-Dietrich bei 37 und 60°	Schultze'sche Reaktion
Sphingomyelin u. Ölsäure u. Lecithin	U. d. M. 70% goldgelb, 40% goldgelb	Dunkelbl.	Schwarz	Bei 37° ungefärbt, b. 60° grauschwarz	Negativ
Sphingomyelin u. Ölsäure und Triolein u. Cholesterin	U. d. M. 70% goldgelb, 40% goldgelb	"	"	Bei 37° graublau, bei 60° schwarz	Grün
Sphingomyelin u. Ölsäure und Triolein und Lecithin	U. d. M. 70% goldgelb, 40% ungefärbt	"	"	Bei 37° ungefärbt, b. 60° grauschwarz	Negativ
Sphingomyelin u. Ölsäure u. Triolein u. Cholesterin und Lecithin	U. d. M. 70% goldgelb, 40% goldgelb	"	"	Bei 37° schwarz, bei 60° schwarz	"

Tabelle 8. Cholesterin und Lecithin in Verbindung mit Fettsäuren und Triglyceriden.

	Sudan	Nilblau	Fischler	Smith-Dietrich bei 37 und 60°	Schultze'sche Reaktion
Cholesterin und Lecithin	Goldgelb	Ungefärbt	Blauschwarz	Bei 37° br. mit grautropf. Einlagerungen, bei 60° braun	Blaugrün
Cholesterin und Lecithin u. Stearinsäure	"	"	Grau	Bei 37° schwarz, bei 60° grauschwarz	"
Cholesterin und Lecithin u. Ölsäure	"	Dunkelblau	Schwarz	Bei 37° graublau, bei 60° schwarz	"
Cholesterin und Lecithin u. Tristearin	"	Ungefärbt	"	Bei 37° braun, bei 60° schwarz	"
Cholesterin und Lecithin u. Triolein	"	Z. T. rosarot, z. T. ungefärbt	Blau	Bei 37° graublau, bei 60° schwarz	Grün
Cholesterin und Lecithin u. Stearinsäure u. Tristearin	"	Ungefärbt	Grauschwarz	Bei 37° ungefärbt, bei 60° schwarz	Blaugrün
Cholesterin und Lecithin u. Stearinsäure u. Triolein	"	Graublau	Schwarz	Bei 37° graublau, stellenw. schwarz, bei 60° schwarz	"
Cholesterin und Lecithin u. Ölsäure und Tristearin	"	Blau	Schwarz (völlig alles diffus schwarz gefärbt)	Bei 37° schwarz, bei 60° blaugrau	Grün
Cholesterin und Lecithin u. Ölsäure und Triolein	"	"	Schwarz	Bei 37° blaugrau, stellenw. schwarz, bei 60° blaugrau, teilweise schwarz	"
Cholesterin und Lecithin u. Stearinsäure u. Ölsäure	"	Dunkelblau	Grauschwarz	Bei 37° graublau, bei 60° graublau, stellenw. schwarz	"

Tabelle 8 (Fortsetzung).

	Sudan	Nilblau	Fischler	Smith-Dietrich bei 37 und 60°	Schultze'sche Reaktion
Cholesterin und Lecithin u. Tristearin und Triolein	Goldgelb	Blau	Ungefärbt	Bei 37° teilw. blaugrau teilw. braun, b. 60° schwarz	Grün
Cholesterin und Lecithin u. Stearinsäure und Ölsäure und Tristearin	"	"	Braunschwarz	Bei 37° graublau, bei 60° zum Teil schwarz, z. T. blau	Blaugrün
Cholesterin und Lecithin u. Stearinsäure und Ölsäure und Triolein	"	Dunkelblau	Schwarz	Bei 37° graublau, bei 60° zum Teil schwarz, zum Teil graublau	Grün
Cholesterin und Lecithin u. Stearinsäure und Ölsäure u. Tristearin und Triolein	"	Blau	Schwarzblau	Bei 37° schwarz, bei 60° schwarz	"

Tabelle 9.

*Glycerin rein und in Kombination mit Fettsäuren, Triglyceriden, Cholesterin und Lecithin.*

	Sudan	Nilblau	Fischler	Smith-Dietrich bei 37 und 60°
Glycerin	Entzieht sich der histologischen Färbung			
Glycerin u. Stearinsäure	In 70proz. alkohol. Lösg. schwachrosa	Ungefärbt	Ungefärbt	Ungefärbt
Glycerin u. Ölsäure	In 70proz. alkohol. Lösg. alles Fett aufgelöst, in 40proz. u. in 20proz. alkohol. Lösung Fett erhalten, goldgelb	Dunkelblau	Schwarz	"
Glycerin u. Stearinsäure und Ölsäure	Rosa	Blau (diffus), auch Schollen gefärbt	"	"
Glycerin und Tristearin	"	Ungefärbt	Ungefärbt	"
Glycerin u. Triolein	Goldgelb	Blau, teilw. rosa	Schwarz	"
Glycerin u. Stearinsäure u. Tristearin	"	Ungefärbt	Teilw. schwz., teilw. ungefärbt	Bei 60° graublau
Glycerin u. Stearinsäure und Triolein	"	Rosa	Diffus schwz.	Ungefärbt

Tabelle 9 (Fortsetzung).

	Sudan	Nilblau	Fischler	Smith-Dietrich bei 37 und 60°	Schultze'sche Reaktion
Glycerin u. Ölsäure und Tristearin	Rosa	Tiefblau	Schwarz	Ungefärbt	—
Glycerin u. Ölsäure und Triolein	Goldgelb	Blauschwarz	"	"	—
Glycerin u. Stearinsäure u. Ölsäure und Tristearin	Rotgelb	"	"	"	—
Glycerin u. Ölsäure und Stearinsäure und Triolein	Goldgelb	Blau	"	"	—
Glycerin u. Stearinsäure u. Ölsäure u. Tristearin u. Triolein	"	Blau (diffus)	"	"	Negativ
Glycerin und Cholesterin	Schwachrosa	Ungefärbt	Ungefärbt	"	"
Glycerin und Lecithin	Goldgelb	"	Diffus schwarz	Bei 37° hellgelbe Tropfen, negative Reaktion, bei 60° hellbraun (keine Lipoidreaktion)	—
Glycerin und Cholesterin u. Lecithin	Rosa	"	Schwarz	Bei 37° ungefärbt, bei 60° braun	Negativ
Glycerin und Cholesterin u. Lecithin und Stearinsäure	70% ungefärbt, 40% goldgelb	"	"	B. 37° graue Tropfen, bei 60° grauschwarz	Blaugrün
Glycerin und Cholesterin u. Lecithin und Ölsäure	70% ungefärbt, 40% goldgelb	Blauschwarz	"	Bei 37° blaugrün, bei 60° blaugrün	"
Glycerin und Cholesterin u. Lecithin und Tristearin	Rosagelb	Ungefärbt	Grauschwarz	Bei 37° hellgelbbraune Tropfen, ungefärbt, b. 60° schwarz	Grün
Glycerin und Cholesterin u. Lecithin und Triolein	Goldgelb	Teils violett, teils blau	Schwarz	Ungefärbt	Negativ

Tabelle 10.

*Eiweiß mit Fettsäuren, Triglyceriden, Cholesterin und Lecithin und Glycerin.*

	Sudan	Nilblau	Fischler	Smith-Dietrich bei 37 und 60°	Schultze'sche Reaktion
Eiweiß und Ölsäure	70% ungefärbt, 40% goldgelb	Dunkelblau	Schwarz	Ungefärbt	Negativ
Eiweiß und Triolein	Goldgelb	Rosa	Ungefärbt	"	"
Eiweiß und Glycerin	Entzieht sich der Färbung				
Eiweiß und Lecithin	Kein Material!				
Eiweiß und Cholesterin	Infolge der Löslichkeitsverhältnisse undurchführbar				

Tabelle 10 (Fortsetzung).

	Sudan	Nilblau	Fischler	Smith-Dietrich bei 87 und 60°	Schultzesche Reaktion
Eiweiß und Ölsäure und Triolein	Goldgelb	Blau	Schwarz	Ungefärbt	Negativ
Eiweiß und Ölsäure und Glycerin	20 % ungefärbt, 40 % <i>reichlich</i> goldgelb	"	"	Bei 37° ungefärbt, bei 60° hellgrau- blau	"
Eiweiß und Ölsäure und Lecithin	70 % ungefärbt, 40 % <i>reichlich</i> goldgelb	"	"	Bei 37° ungefärbt, b. 60° grauschwarz	"
Eiweiß und Ölsäure und Cholesterin	70 % kein Fett gefärbt, alles aufgelöst, 40 % <i>reichlich</i> gold- gelb	"	"	Bei 37° ungefärbt, bei 60° hellgrau- blau	Grünblau
Eiweiß und Ölsäure und Triolein und Glycerin	Goldgelb	"	"	Ungefärbt	Negativ
Eiweiß und Ölsäure und Triolein und Lecithin	"	"	"	Bei 37° ungefärbt, bei 60° hellgrau- blau	"
Eiweiß und Ölsäure und Triolein und Cholesterin	"	"	"	Bei 37° ungefärbt, b. 60° helles grau- blau	Blau
Eiweiß und Ölsäure und Triolein und Glycerin u. Lecithin	"	"	"	Bei 37° ungefärbt, bei 60° hellgrau- blau	Negativ
Eiweiß und Ölsäure und Triolein und Glycerin und Cholesterin	"	"	"	Bei 37° ungefärbt, bei 60° graublau	Grünblau
Eiweiß und Ölsäure und Triolein und Glycerin u. Lecithin u. Cholesterin	"	"	"	Bei 37° ungefärbt, bei 60° hellgrau- blau	Negativ

Tabelle 11. *Phrenosin rein und Kerasin rein und in Mischungen mit Ölsäure, Triolein, Cholesterin und Lecithin.*

	Sudan	Nilblau	Fischler	Smith-Dietrich bei 37 und 60°	Schultzesche Reaktion
Phrenosin	U. d. M. 70 % goldgelb, 40 % goldgelb	Ungefärbt	Ungefärbt	37° ungefärbt, 60° schwarzgrau	Negativ
Phrenosin und Öl- säure	40 % goldgelb	Dunkelbl.	Schwarz	37° ungefärbt, 60° schwarz	"
Phrenosin und Trio- lein	Goldgelb	Violett	Ungefärbt	37° ungefärbt, 60° schwarz	"
Phrenosin und Chol- esterin	40 % goldgelb	Ungefärbt	Schwarz	37° grauschwarz, 60° schwarz	"

Tabelle 11 (Fortsetzung).

	Sudan	Nilblau	Fischler	Smith-Dietrich bei 37 und 60°	Schultze'sche Reaktion
Phrenosin und Lecithin	U. d. M. 70 % goldgelb, 40 % goldgelb	Ungefärbt	Ungefärbt	37° schwarz, 60° schwarz	Negativ
Phrenosin u. Ölsäure und Triolein	40 % goldgelb	Dunkelbl.	Schwarz	37° ungefärbt, 60° schwarz	"
Phrenosin u. Ölsäure und Cholesterin	" "	"	"	37° ungefärbt, 60° schwarz	"
Phrenosin u. Ölsäure und Lecithin	" "	"	"	37° ungefärbt, 60° schwarz	"
Phrenosin u. Ölsäure und Triolein und Cholesterin	" "	"	"	37° schwarz, 60° schwarz	"
Phrenosin u. Ölsäure und Triolein und Lecithin	U. d. M. 70 % goldgelb, 40 % goldgelb	"	"	37° grau, 60° schwarzgrau	"
Phrenosin u. Ölsäure und Triolein und Cholesterin und Lecithin	40 % goldgelb	"	"	37° schwarz, 60° schwarz	Blaugrün
Kerasin	" "	Ungefärbt	Ungefärbt	37° grauschwarz, 60° grauschwarz	Negativ
Kerasin u. Ölsäure	" "	"	Schwarz	37° br., 60° schwarz	"
Kerasin u. Triolein	U. d. M. 70 % goldgelb, 40 % goldgelb	Dunkelbl.	Ungefärbt	37° schwarz, 60° schwarz	"
Kerasin und Cholesterin	U. d. M. gold- gelb, 40% gold- gelb	Ungefärbt	"	37° schwarzgrau, 60° schwarz	Grün
Kerasin u. Lecithin	40 % goldgelb	Blau	"	37° ungefärbt, 60° schwarz	Negativ
Kerasin u. Ölsäure und Triolein	U. d. M. 70 % goldgelb, 40 % goldgelb	Rosarot	Schwarz	37° ungefärbt, 60° grauschwarz	"
Kerasin u. Ölsäure und Cholesterin	40 % goldgelb	Dunkelbl.	"	37° schwarz, 60° schwarz	"
Kerasin u. Ölsäure und Lecithin	" "	"	Ungefärbt	37° ungefärbt, 60° schwarz	"
Kerasin u. Ölsäure und Triolein und Cholesterin	U. d. M. 70 % goldgelb, 40 % goldgelb	"	Schwarz	37° grauschwarz, 60° grauschwarz	Grün
Kerasin u. Ölsäure und Triolein und Lecithin	40 % massen- haft goldgelb	"	"	37° gr., 60° schwarz	Negativ
Kerasin u. Ölsäure und Triolein und Cholesterin und Lecithin	U. d. M. gold- gelb, 40% gold- gelb	"	"	37° schwarz, 60° schwarz	Grün

Tabelle 12. *Cholesterinölsäureester rein, Cholesterinstearinsäureester rein und in Mischungen mit Ölsäure Triolein, Cholesterin und Lecithin.*

	Sudan	Nilblau	Fischler	Smith-Dietrich bei 37 und 60°	Schultze'sche Reaktion
Cholesterinölsäureester	Goldgelb	Ungefärbt	Ungefärbt	37° ungefärbt, 60° blaugrau	Negativ
Cholesterinölsäureester und Ölsäure	70 % goldgelb	Dunkelbl.	Schwarz	37° grau, 60° grau	"
Cholesterinölsäureester und Triolein	" "	Violettros.	Ungefärbt	37° schwarz, 60° schwarz	"
Cholesterinölsäureester und Ölsäure und Triolein	Goldgelb	Violettbl.	Schwarz	37° grau, 60° grau	"
Cholesterinölsäureester und Cholesterin	70 % goldgelb	Ungefärbt	"	37° ungefärbt, 60° ungefärbt	Grün
Cholesterinölsäureester u. Lecithin	" "	"	"	37° schwarz, 60° schwarz	Negativ
Cholesterinölsäureester und Ölsäure und Cholesterin	" "	Dunkelbl.	"	37° grau, 60° blaugrau	"
Cholesterinölsäureester und Ölsäure und Lecithin	" "	"	"	37° blaugrau, 60° blaugrau	"
Cholesterinölsäureester und Ölsäure und Triolein und Cholesterin	" "	"	"	37° grau, 60° grau-schwarz	Grün
Cholesterinölsäureester und Ölsäure und Triolein und Lecithin	" "	"	"	37° schwarz, 60° schwarz	Negativ
Cholesterinölsäureester und Ölsäure und Triolein und Cholesterin und Lecithin	" "	"	"	37° schwarz, 60° schwarz	Grün
Cholesterinstearinsäureester	70 % goldgelb, 40 % ungefärbt	Ungefärbt	Ungefärbt	37° ungefärbt, 60° ungefärbt	Negativ
Cholesterinstearinsäureester u. Ölsäure	70 % ungefärbt, 40 % massenhaft goldgelb	Dunkelbl.	Schwarz	37° ungefärbt, 60° ungefärbt	"
Cholesterinstearinsäureester u. Triolein	70 % goldgelb	Rosarot	Ungefärbt	37° ungefärbt, 60° ungefärbt	"
Cholesterinstearinsäureester und Ölsäure und Triolein	70 % goldgelb	Dunkelbl.	Schwarz	37° ungefärbt, 60° ungefärbt	Negativ
Cholesterinstearinsäureester u. Cholesterin	" "	Ungefärbt	Ungefärbt	37° ungefärbt, 60° ungefärbt	Grün

Tabelle 12 (Fortsetzung).

	Sudan	Nilblau	Fischler	Smith-Dietrich bei 87 und 60°	Schultze'sche Reaktion
Cholesterinstearinsäureester u. Lecithin	70 % ungefärbt, 40 % reichlich gelb	Ungefärbt	Ungefärbt	37° ungefärbt, 60° ungefärbt	Negativ
Cholesterinstearinsäureester u. Ölsäure und Cholesterin	70% wenig goldgelb, 40 % massenhaft goldgelb	Dunkelbl.	Schwarz	37° ungefärbt, 60° ungefärbt	„
Cholesterinstearinsäureester u. Ölsäure u. Lecithin	70% wenig goldgelb, 40 % massenhaft goldgelb	„	„	37° ungefärbt, 60° ungefärbt	„
Cholesterinstearinsäureester u. Ölsäure u. Triolein und Cholesterin	70 % goldgelb	„	„	37° ungefärbt, 60° grau	„
Cholesterinstearinsäureester u. Ölsäure u. Triolein und Lecithin	„ „	„	„	37° ungefärbt, 60° schwarz	„
Cholesterinstearinsäureester u. Ölsäure u. Triolein und Cholesterin und Lecithin	„ „	Dunkelbl.	Schwarz	37° schwarz, 60° schwarz	Grün

Auf Grund dieser Ergebnisse glauben wir die Frage beantworten zu dürfen, was wir mit den fünf geprüften Methoden erreichen.

Die Sudanfärbung ist bei sämtlichen geprüften Fetten und Fettgemischen mit Ausnahme von zwei gesättigten Fettsäuren positiv, so daß wir dieser Färbung eine ganz überragende Rolle für die Färbung von Fettstoffen und Fettgemischen im allgemeinen zusprechen. Eine Differenzierung bestimmter Fettstoffe gelingt jedoch nicht. Auf die Gefahren der Färbung mit 70 proz. alkoholischer Lösung haben wir schon oben hingewiesen.

Leider haben unsere Versuche, die Färbung mit schwachprozentigen alkoholischen Sudanlösungen auf den Gewebsschnitt zu übertragen, unbefriedigende Ergebnisse gezeitigt.

Sehr viel schwieriger gestalten sich die Verhältnisse bei den anderen Methoden.

In der Beurteilung der Nilblaufärbung weichen wir von den bisher üblichen Anschauungen beträchtlich ab. Nach den auch von *Schmorl* angeführten Untersuchungen von *Boehminghaus* soll Nilblausulfat ein Reagenz auf Ölsäure und ihre Ester sein. *Boehminghaus* weist als erster in seiner Arbeit auf die Bedeutung der Lückenbindung für

den positiven Ausfall der Färbung hin, beschränkt sich aber auf die Prüfung der Ölsäure.

Wir bestätigen, daß das Nilblau ausgesprochene Verwandtschaft zu Stoffen mit Lückenbindung hat, in unseren Versuchen zu fast sämtlichen ungesättigten Fettsäuren und zum ungesättigten Triglycerid, erstere werden dunkelblau, letztere rosarot gefärbt. Es färben sich aber auch einige Substanzen ohne Lückenbindung.

Eine Affinität zum Cholesterinester der Ölsäure lehnen wir ab, ebenso eine solche zum Cholesterinester der Stearinsäure. Daß die von uns geprüften Ester frisch hergestellt und nicht in Formol fixiert zur Untersuchung kamen, erwähnen wir der Vollständigkeit halber. In sämtlichen Mischungen, in denen zugleich ungesättigte Fettsäure und ungesättigtes Triglycerid vorhanden ist, überwiegt die Stärke der Blaufärbung der Fettsäure, verdeckt also gewissermaßen die Rosafärbung der ungesättigten Triglyceride. Man könnte auf Grund dieser Ergebnisse am ungemischten Reinsubstrat versucht sein, eine allerdings nicht leicht zu bestimmende spezifische Gruppenreaktion für das Nilblau aufzustellen, wenn nicht der Zusatz von Cholesterin, Lecithin, Kerasin und Glycerin die Farbeergebnisse wesentlich beeinflusste, Mischungen, mit denen wir in Geweben rechnen müssen, so daß zwar die Rosafärbung, aber nicht die Dunkelblaufärbung verlässlich ist.

In Gruppe 5 ergibt eine positive Blaufärbung Cholesterin und Triolein, in Gruppe 6 Lecithin und Palmitinsäure und Triolein, ebenfalls Lecithin und Stearinsäure und Triolein, in Gruppe 7 Cholesterin und Lecithin und Stearinsäure und Triolein, ferner Cholesterin und Lecithin und Tristearin und Triolein, in Gruppe 8 Glycerin und Triolein, ferner Glycerin und Cholesterin und Lecithin und Triolein, in Gruppe 9 Kerasin und Triolein, Kerasin und Lecithin. Zum Schlusse sei erwähnt, daß die Mischung Kerasin und Ölsäure ungefärbt blieb.

Bezüglich der Rosafärbung der Neutralfette stimmen wir also mit den bisherigen Anschauungen überein und verweisen auf unsere über diese Farbreaktion oben gemachten Ausführungen, während wir die Blaufärbung als für Fettsäuren spezifisch nicht anerkennen können.

Die Färbung von *Fischler* soll dem Nachweis von Fettsäuren dienen, unsere Bedenken gegen die Spezifität der Methoden finden wir durch unsere Untersuchungen völlig bestätigt.

Die Farblackbildung trat in zahlreichen Gemischen auf, in denen keine Spur von freier Fettsäure vorhanden war. In Gruppe 5 bei Cholesterin und Triolein, in Gruppe 6 bei Lecithin und Tripalmitin, Lecithin und Triolein, in Gruppe 7 bei Sphingomyelin und Cholesterin, bei Sphingomyelin und Lecithin, in Gruppe 8 bei Cholesterin und Lecithin, bei Cholesterin und Lecithin und Tristearin, in Gruppe 9 bei Glycerin und Triolein, Glycerin und Lecithin, Glycerin und Cholesterin und



Lecithin, Glycerin und Cholesterin und Lecithin und Tristearin, Glycerin und Cholesterin und Lecithin und Triolein, in Gruppe 11 bei Phrenosin und Cholesterin, in Gruppe 12 bei Cholesterinölsäureester und Cholesterin, und bei Cholesterinölsäureester und Lecithin.

Ob es in diesen Fällen zur Kupferkomplexsalzbildung kommt, oder ob bestimmte Molekülgruppen dieser Stoffe zur Kupfersalzbildung befähigt sind, muß unentschieden bleiben.

Die eben erwähnten Regelwidrigkeiten lassen sich sicher bei Prüfung weiterer Mischungen vermehren.

Daß bei Anwesenheit von freier Fettsäure die Farblackbildung ausbleiben kann, fanden wir in 5 Fällen.

Die Smith-Dietrichsche Färbung soll bei den Phosphatiden und Cerebrosiden — in unseren Versuchen also bei Lecithin, Sphingomyelin, Phrenosin und Kerasin — nach *Kawamura* ferner bei Cholesterinfettsäuregemischen und freien Fettsäuren positiv sein. Als positiv darf nach unseren Ergebnissen nur eine tiefschwarze Färbung gelten, die von vielen Untersuchern erwähnte blaugraue Färbung ist vollständig uncharakteristisch und tritt in den aller verschiedensten Mischungen auf. Der Ausfall der Färbung ist in hohem Maße von der bei der Färbung innegehaltenen Temperatur abhängig, die Färbung bei 37° ist für die Prüfung des chemischen Reinsubstrats in der Mehrzahl der Fälle ungeeignet. Wir haben uns auch am Gewebsschnitt von Unterschieden des positiven bzw. negativen Ausfalls der Färbung bei Anwendung der beiden verschiedenen Temperaturen überzeugen können.

Wenn wir die bei 60° gefärbten Schnitte als maßgebend betrachten, so fanden wir beide reinen Phosphatide und beide reinen Cerebroside schwarz gefärbt, die schönsten Färbungen ergaben Mischungen der genannten Stoffe mit Fettsäuren und Triglyceriden.

Sehr häufig war die Reaktion bei Anwesenheit eines Phosphatids negativ bei Zusatz von Eiweiß oder Glycerin.

Neben den Phosphatiden und Cerebrosiden färben sich in unserem Material — und wir stehen in diesem Punkte in unbedingtem Gegensatz zu *Kawamura* — Cholesterinestergemische (Gruppe 12), während Cholesterinfettsäuregemische (Gruppe 5) in keinem einzigen Falle eine positive Färbung ergaben. Ferner fanden wir im Gegensatz zu *Kawamura* die Färbung bei sämtlichen Fettsäuren negativ.

In unserer ersten Arbeit haben wir nachgewiesen, daß die von *Kutschera-Aichbergen* vermeintlich festgestellte Tatsache der Unfärbbarkeit des Lecithins hinfällig ist, da die Löslichkeitsveränderung eines Lecithingemisches unberücksichtigt blieb. Wir verweisen auf unsere in der Arbeit gemachten Angaben.

In der Beurteilung der *Schultzeschen* Cholesterinreaktion befinden wir uns in so völliger Übereinstimmung mit *Schultze*, daß eine ausführ-

lichere Erörterung nur eine Wiederholung der Tatsachen bedeutete, mit denen *Schultze* uns bekannt gemacht hat. Positiv war die Reaktion in keinem Falle, in dem kein Cholesterin vorhanden war, negativ allerdings bei Anwesenheit von Cholesterin in einer ganzen Reihe von Fällen, und zwar insbesondere bei Mischungen, in denen Glycerin, Phrenosin und Kerasin vorhanden waren.

Wie wir oben ausgeführt haben, ist nicht anzunehmen, daß irgendwelche Farbstoffe gefunden werden, die Anspruch auf Spezifität für Gruppen, geschweige denn für Einzelstoffe erheben könnten.

Der einzige zuverlässige Weg ist der der qualitativen und quantitativen chemischen Analyse.

---