Aus der Königlich chirurgischen Universitäts-Klinik Breslau.
(Director: Geheimrath Prof. Dr. Küttner.)

Chemische Constitution und Vitalfärbungsvermögen.

Von

Werner Schulemann.

Nachdem wir durch Ehrlich's Arbeiten mit der Eigenschaft des Neutralroths, Zellen des thierischen und pflanzlichen Körpers vital zu färben, bekannt geworden sind, ist es das Bestreben der Forscher gewesen, einerseits den Mechanismus der Färbung aufzudecken, andererseits neue Farben von gleichem oder ähnlichem Verhalten aufzufinden. Eine einheitliche Erklärung für die Wirkung der Vitalfarben zu geben, ist aber bisher nicht möglich gewesen. Die einen behaupten, es kämen nur physikalische Bedingungen für die Ablagerung in Frage, nach der Meinung anderer aber ist die Vitalfärbung allein abhängig von chemischen Reactionen. Vermittelnd zwischen beiden Anschauungen stehen die Ansichten Hoeber's und Traube's, nach denen die Vertheilung und Ablagerung (von Sulfosäurefarbstoffen bei dem einen, von pharmakologisch wirksamen Substanzen bei dem anderen) von physiko-chemischen Bedingungen abhängig ist. Diese scheinbar schroffen Widersprüche lösen sich leicht, wenn man bedenkt, dass die Untersuchungen zum Theil mit ganz heterogenen Farbstoffen und an dem verschiedensten Zellmaterial ausgeführt sind. Ebenso verschieden wie das lipoidunlösliche Trypanblau von dem lipoidlöslichen Neutralroth ist, ist auch der Charakter eines Paramaeciums, einer Hautzelle von Salamanderlarven und einer Leberzelle eines Säugethieres. Es ist selbstverständlich, dass wir Resultate, die mit so verschiedenen Farbstoffen an einem so variablen Zellmaterial gewonnen sind, nicht ohne weiteres vergleichen dürfen, — und das ist leider oft geschehen. Um endlich ein klares Bild von den die Vertheilung und Ablagerung der „Vitalfarben“ beherrschenden Gesetzen zu erhalten, ist es unbedingt nothwendig, ein durchaus einheitliches Untersuchungsmaterial in den Händen zu haben. Hoeber hat damit den Anfang gemacht, indem er die Ausscheidung von Farben, die er von physiko-chemischen Gesichtspunkten aus zusammengestellt hatte, an der Froshniere studirte.

Ich will nun im Folgenden über Untersuchungen berichten, die ich mit Farben anstellte, die sowohl vitalfärbend sind, als auch selbst phar-

makologische Wirkung und ferner grosse Aehnlichkeit mit dem Salvarsan zeigen. Es war mir von besonderem Interesse, nicht nur die Gesetze der Vertheilung und Ablagerung zu studiren, sondern vor allem die Gründe herauszufinden, aus denen ähnliche Substanzen unwirksam sind. So dachte ich Richtlinien zur Synthese chemotherapeutisch verwendbarer Substanzen zu finden.

Durch Nicolle und Mesnil wurden 1906 zwei Farbstoffe entdeckt, die therapeutisch gegen Trypanosomiasis verwendbar waren, das Trypanblau und Trypanviolett. Schon vorher hatte Ehrlich ausgehend vom Benzopurpurin das Trypanroth bei Trypanosomeninfection wirksam gefunden. Es zeigte sich nun als scheinbare Nebenwirkung, dass viele der untersuchten Farben, besonders aber Trypanblau und -roth die inficirten Thiere färbten. Die beiden französischen Autoren konnten aber keinerlei Beziehungen zwischen chemischer Constitution und Vitalfärbungsvermögen finden. Die Vertheilung einiger dieser Benzidinfarben im Thierkörper untersuchte dann Bouffard. Aber auch er förderte das Problem nur wenig, da er nur makroskopische Untersuchungen anstellte.

Erst die exacte mikroskopische Analyse der Färbung durch Goldmann zeigte uns die mannigfachen Anwendungsmöglichkeiten der neuen Vitalfärbung. In seinen Arbeiten über „Die äussere und innere Secretion des gesunden und kranken Organismus im Lichte der vitalen Färbung“ sind neben einer Fülle neuer Thatsachen die Grundzüge der neuen Methode nahezu vollständig von ihrem Begründer dargelegt und bedürfen nur noch weiteren Ausbaues, um uns viele interessante Ergebnisse auf fast allen Gebieten medicinischer Wissenschaft zu geben.

In einer früheren Arbeit hatte ich das Trypanblau zum Ausgangspunkt meiner Untersuchungen gewählt. Ich versuchte nun durch Verwendung ähnlicher Farbstoffe die Bedingungen seiner Vertheilung und Ablagerung herauszufinden, besonders aber auch den gänzlich von den bisher bekannten abweichenden Thatsachen, den durch Goldmann's Arbeiten gefundenen Charakter der Färbung zu erklären. Da mir früher nur wenige Farben zur Verfügung standen, hatte ich nur Vermuthungen aussprechen können. Die vorliegenden Untersuchungen sind nun an über 200 mit dem Trypanblau verwandten Substanzen und für das klassische Untersuchungsobject — die weisse Maus — ausgeführt worden. Als nothwendig stellte sich die histologische Untersuchung des ganzen Thieres heraus. In vielen Fällen wurden auch noch Versuche mit Tauben, Meerschweinchen, Kaninchen, Ratten, Hunden und Affen ausgeführt. Ich möchte gleich hier bemerken, dass die Färbung fast stets die gleichen Zellen bei allen diesen Thierarten betrifft.

Die auffallende structurelle Aehnlichkeit des Trypanblaus (Tab. IX, 1)¹⁾ mit dem Salvarsan (Tab. IX, 8) liess mich vermuthen, dass die Wirkung der Farbe geknüpft sei an den Peri-amido-naphtholoceptor. Nach Ehrlich's Theorie verankert sich das Salvarsan am Protoplasma primär durch den Ortho-amido-phenoloceptor. Dieser

1) Um die Lectüre der Arbeit zu erleichtern, sind die Constitutionsformeln der hier citirten Verbindungen in Tabellenform beigegeben.

zweimal im Salvarsan enthaltene Chemoceptor ist der Benzolring mit der Hydroxyl- ($-\text{OH}$) und der Amino- ($-\text{NH}_2$)-gruppe in Ortho-(1:2)-stellung, also:

wobei R die in Para-(1:4)stellung toxophore Gruppe — die Arsenobindung ($-\text{As} = \text{As}-$) bedeutet. Das Trypanblau enthält diesen Chemoceptor ebenfalls, nur liegt ihm statt des Benzolringes der Naphthalinring zu Grunde. Ferner finden sich an demselben noch zwei Sulfosäure- ($-\text{SO}_3\text{Na}$)-gruppen, über deren Bedeutung wir später zu sprechen haben.

Der Peri-amido-naphtholoceptor des Trypanblaus wäre demnach durch folgendes Schema gekennzeichnet:

Hier ist durch R_1 die Azobindung ($-\text{N} = \text{N}-$) bezeichnet, die nicht toxisch ist, aber chemisch der Arsenobindung fast gleichwerthig. Die Aehnlichkeit wird noch grösser, wenn man bedenkt, dass der Ortho-(1:2)-stellung am Benzolring die Peri-(1:8)-stellung am Naphtalinring entspricht — eine den Chemikern lange bekannte Thatsache.

Ehrlich's Theorie nimmt nun an, dass die haptophoren Chemoceptoren des Salvarsans (also die Ortho-amido-phenoloceptoren) mit entsprechenden Chemoceptoren des Protoplasmas (auch Receptoren oder allgemein Seitenketten genannt) in Reaction treten und auf diese Weise das Salvarsan in der Zelle verankert würde.

Es lag nun sehr nahe, diese Anschauungen auch auf unsere Farben zu übertragen und zu versuchen etwas Genaueres über diese Verankerungsreaction zu ermitteln. Obwohl viel Literatur darüber existirt, sind nur spärliche Thatsachen bekannt geworden.

Durch histologische Arbeiten nach den alten Methoden — besonders über Zellgranula — war ich zu der Anschauung gekommen, dass das Problem nur von der rein chemischen Seite aus angreifbar sei. Voregreifend, will ich gleich hier erwähnen, dass sich dieser Standpunkt nicht

halten liess und die gefundenen Thatsachen von rein chemischen Gesichtspunkten aus nicht erklärbar waren.

Die Thatsache, dass unsere Farben viele Monate hindurch von der lebenden Zelle festgehalten wurden, schien allerdings auf sehr feste chemische Bindung von Farbe mit Protoplasma zu deuten. Dem gegenüber schien es merkwürdig, dass Nicolle und Mesnil sagen: „Das Trypanblau und seine Verwandten seien durch die Amidogruppen gegen Trypanosomen wirksam“. Trotzdem diese NH_2 -Gruppe als integrierender Bestandtheil des Chemoceptors functionirt, müsste sie — obwohl mit dem „Receptor“ chemisch gebunden — soweit frei sein, dass sie eine toxische Wirkung auf das Trypanosom ausüben könne. Ein scheinbar nicht zu vereinender Widerspruch.

Diesen Ueberlegungen entsprechend, müssen hier Versuche angeführt werden, welche zum Zweck hatten, die topische Vertheilung des Salvarsans im Thierkörper festzustellen. Nach dem Verfahren von Abelin suchte ich gemeinsam mit Herrn Herbert M. Evans M. D. (Baltimore, Johns Hopkins Medical School) das in den Zellen abgelagerte Salvarsan in einen Farbstoff zu verwandeln. Abelin's Methode sucht das Salvarsan im Harn von Personen nachzuweisen nach der Behandlung mit 606. Durch Zusatz von Natriumnitrit und Salzsäure diazotirte er das Salvarsan im Harn und kuppelte mit Resorcin. Bei positivem Ausfall entstand ein gelbrother Farbstoff, den man auch aus reiner 606-Lösung darstellen kann. Von vornherein war die Frage, ob das Salvarsan unverändert den Körper passirt habe und ferner, ob der entstehende Farbstoff noch das Arsen enthalte. Beruht doch Abelin's Methode allein auf dem Nachweis der Amidogruppe. Die Anwendung dieser Methode zum Nachweis des Salvarsans in der Zelle bot wenig günstige Chancen. Unsere trotzdem gemachten Versuche verliefen auch völlig negativ. Zudem ist neuerdings von Benda der Beweis erbracht, dass beim Diazotiren des Salvarsans das Arsen abgespalten wird.

Mit Hülfe eines Verfahrens von Ehrlich war schon früher der Versuch von Hata gemacht worden, die Vertheilung des Salvarsans im Thierkörper festzustellen. Diese Methode ist aussichtsreicher, obwohl sie auch auf dem Nachweis der Amidogruppe beruht. Bringt man 2 Moleküle Paradimethylamidobenzaldehyd mit 1 Molekül Salvarsan zusammen, so entsteht nach folgendem (hypothetischem) Schema

ein Farbstoff, der mit Mercurichlorid einen gelben, unlöslichen Körper abscheidet. Aber auch auf diese Weise ist es nicht gelungen, die cellu-

läre Vertheilung des 606 exact festzustellen. Makroskopisch ist das Auftreten des gelben Farbstoffes jedoch festzustellen. Mithin reagirt die Amidogruppe des abgelagerten Salvarsans mit dem Aldehyd, scheint also nicht in fester chemischer Bindung mit dem Protoplasma zu sein.

Ich will mich nicht weiter in Theorien verlieren und nochmals all die Irrwege gehen, die ich gegangen bin, ehe ich zu einheitlichen Gesichtspunkten kam. Jedenfalls gelang es mir — ebenso wie Nicolle und Mesnil — lange Zeit hindurch ebenfalls nicht Beziehungen zwischen chemischer Constitution und Vitalfärbungsvermögen aufzufinden.

Inwieweit mir das jetzt gelungen ist, mögen die folgenden Zeilen zeigen. Zu absolut sicheren Beweisen scheint mir das vorliegende Material auch heute noch nicht ausreichend und besonders möchte ich vor nicht gut fundirten Verallgemeinerungen warnen. Vielleicht aber gelingt es mir, einige neue Gesichtspunkte beizubringen.

Eine Beobachtung am Benzopurpurin B (Tab. VII, 1) veranlasste mich, den rein chemischen Standpunkt aufzugeben und nach physiko-chemischen Gesichtspunkten weiter zu arbeiten.

Mit einer frisch bereiteten Lösung dieser Farbe hatte ich gute Vitalfärbung erhalten. Bei einer neuen Serie von Versuchen benutzte ich die alte Vorrathslösung. Ein grosser Theil der Thiere starb, der Rest erkrankte vorübergehend und nur langsam trat Färbung ein. Es stellte sich dann heraus, dass die Lösung zu einem Hydrogel — einer weichen Gallerte — geworden war. Das veranlasste mich, meine Aufmerksamkeit auf den Colloidzustand der Farblösungen zu richten.

Demgemäss musste auch die Fragestellung geändert werden. Ich suchte nicht mehr:

Welche Beziehungen bestehen zwischen chemischer Constitution und Vitalfärbungsvermögen?

sondern

A. Welche Beziehungen bestehen zwischen chemischer Constitution und physiko-chemischem Charakter der Farblösungen?

und

B. Welchen physiko-chemischen Charakter müssen die Farblösungen haben, um vitalfärbend zu wirken?

Zu ganz ähnlichen Befunden wie ich, kam Hoeber bei seinen Versuchen an der Froschniere. In seinem ausgezeichneten Buche: „Die physikalische Chemie der Zelle und der Gewebe“ (Leipzig 1911, III. Aufl.), das ich sehr zur Orientirung über physiko-chemische Probleme empfehlen möchte, fasst er seine Resultate S. 539 kurz zusammen:

„Lipoidlösliche und lipoidunlösliche Farbstoffe beliebiger chemischer Constitution können in die Epithelien der zweiten Abschnitte der Froschniere importirt werden, während dagegen die physiko-chemische Beschaffenheit gewisse Beschränkungen auferlegt. Nämlich diejenigen Farbstoffe, welche von den Epithelien nicht aufgenommen werden, erweisen sich sämmtlich durch den Mangel an Diffusionsvermögen, durch

die Empfindlichkeit gegen Elektrolyte und durch das ultramikroskopische Bild ihrer Lösungen als Suspensionscolloide. Freilich werden auch einige suspensionscolloide Farbstoffe importirt. Aufgenommen werden ferner sämtliche echt gelöste und halbcolloide Farbstoffe, welche an die hydrophilen Colloide erinnern, insofern als sie einerseits nicht diffundiren, andererseits aber sehr elektrolytbeständig sind und dem ultramikroskopischen Bilde nach echte Lösungen bilden.“

Eine exacte physiko-chemische Analyse meiner Farblösungen konnte ich noch nicht vornehmen, werde aber bald darüber berichten. Vieles konnte der Literatur jedoch entnommen werden. Ferner besitzen wir auch an der Schaumbildung und besonders an der Hydrogelbildung Kriterien, die uns annähernd ein Bild vom physiko-chemischen Lösungscharakter geben.

Am klarsten liegen die Verhältnisse beim Benzopurpurin und seinen Verwandten. Benzopurpurin B (Tab. I, 1) ist ein hydrophiles Colloid und färbt vital. Benzopurpurin 4 B (Tab. I, 2) dagegen ist ein Suspensionscolloid und färbt nicht vital. Ebenso wie Benzopurpurin 4 B verhält sich das Diaminviolett N (Tab. I, 3).

Ebenso wie Benzopurpurin 4 B färbt auch Azoblau (Tab. I, 6) nicht vital und zeigt ausgeprägten suspensions-colloiden Charakter. Der dem Benzopurpurin B entsprechende hydroxylhaltige Farbstoff fehlt mir leider noch in meiner Sammlung. Aus dem Verhalten der Farben Dianilblau 4 R (Tab. I, 4) und Dianilblau 2 R (Tab. I, 5) können wir jedoch einige Schlüsse ziehen. Beide Substanzen sind Vitalfarben auf Grund ihrer linken Seiten [die symmetrische Farbe ist Dianilblau R (Tab. IV, 4)]. In gleicher Concentration und unter gleichen Bedingungen in Wasser gelöst, tendirt jedoch Dianilblau 4 R weit mehr zur Hydrogelbildung als Dianilblau 2 R, dessen rechte Seite den Verhältnissen im Azoblau entspricht. Ich gehe wohl nicht fehl, wenn ich auf Grund dieser That-sachen vermuthet, dass β -substituirte Naphthaline in den Seitenketten der Farben eine Ursache der Gelbildung sind.

Dem liesse sich einwenden, dass der Vergleich der sechs auf Tabelle I zusammengestellten Farben nicht erlaubt sei, da sie sich zum Theil vom Benzidin (Tab. I, 3 und 4), zum Theil vom o-Tolidin (Tab. I, 1, 2, 5 und 6) ableiten. Auf Tabelle II habe ich 3 Paar Farbstoffe zusammengestellt, die beweisen, dass ein Mehr oder Weniger von 2 Methyl ($-\text{CH}_3$) für unsere Farben relativ belanglos ist“. Ich betone ausdrücklich „für unsere Farben“. Bei anderen Substanzen, besonders kleiner molecularen, kann das Radical sehr wohl bestimmend auf den Charakter der Farben einwirken. Hier ist aber Diaminblau 2 B (Tab. II, 1) von gleicher Wirkung wie Trypanblau (Tab. II, 2). Ferner bleibt Brillant-Congo-G (Tab. II, 3) vitalfärbend als Brillant-Congo-R (Tab. II, 4). Umgekehrt wird aber auch das nicht vitalfärbende Congo (Tab. II, 5) durch Einführung von 2 $-\text{CH}_3$ nicht zur Vitalfarbe als Benzopurpurin 4 B (Tab. II, 6).

Vor ähnliche für uns relativ belanglose Constitutionsände-

rungen werden wir noch öfter gestellt werden, weshalb ich diesem Einwande gleich hier begegnen will. Tabelle III zeigt

(Tab. III, 1)	Diaminblau 2 B	vom Benzidin,
(Tab. III, 2)	Trypanblau	„ Tolidin,
(Tab. III, 3)	Farbe No. 155	„ p. Diamidostilben,
(Tab. III, 4)	Trypanviolett	„ Diamido-di-phenylharnstoff

abgeleitet. Der Vergleich ist exact, da sich nur das Bindeglied und nicht die beiden seitlichen Naphthalinderivate — weder in Art noch in Stellung — geändert haben. Alle vier Substanzen sind Vitalfarben. Nur Trypanviolett fällt als leichter diffusibler Körper etwas aus der Reihe. Er färbt in viel kürzerer Zeit, aber in der gleichen Weise vital.

Zu beweisen ist ferner die Richtigkeit des Vergleiches des Dianilblau 4 R (Tab. I, 4), Dianilblau 2 R (Tab. I, 5) und Azoblau (Tab. I, 6). Hier ist die Symmetrie des Molecüls verloren gegangen.

Auf Tabelle IV stellt Diaminblau 2 B (Tab. IV, 1) eine Vitalfarbe dar. Es ist symmetrisch gebaut und muss, da es vital färbt, zwei positive Seiten enthalten, d. h. zwei Seiten, welche die Farbe zur Vitalfarbe machen. Im Diaminviolett N (Tab. IV, 3) haben wir eine Substanz vor uns, die nicht vital färbt; dagegen ist wieder Diaminschwarz BH (Tab. IV, 2) vitalfärbend. Bezeichnen wir die Seiten des Diaminblau 2 B (Tab. IV, 1) als positive, so müssen wir die des Diaminviolett N (Tab. IV, 3) als negative bezeichnen. Zwischen beiden steht dann das Diaminschwarz BH (Tab. IV, 2) mit einer positiven und einer negativen Seite, wobei die positive über die negative überwiegen muss, weil Diaminschwarz BH (Tab. IV, 2) eine Vitalfarbe ist.

Ebenso liegen die Verhältnisse bei Dianilblau R (Tab. IV, 4), Dianilblau 2 R (Tab. IV, 5), Azoblau (Tab. IV, 6) und Dianilblau 4 R (Tab. IV, 7). Dianilblau R (Tab. IV, 4) ist eine Vitalfarbe, Azoblau (Tab. IV, 6) färbt nicht vital. Nach dem symmetrischen Bau müssen wir sagen: Dianilblau R (Tab. IV, 4) enthält 2 positive, Azoblau (Tab. IV, 6) zwei negative Seiten. Dazwischen steht Dianilblau 2 R (Tab. IV, 5) aus einer positiven und einer negativen Seite zusammengesetzt.

Stellen wir uns die entsprechenden Seiten des Benzopurpurin B (Tab. I, 1) und Dianilblau 4 R (Tab. I, 4) und die des Benzopurpurin 4 B (Tab. I, 2) und Dianilblau 2 R (Tab. I, 5) oder Azoblau (Tab. I, 6) zusammen:

Verglichen mit den physiko-chemischen Eigenschaften der Farblösungen machen die positiven Seiten die Farben zu hydrophilen Colloiden, die negativen zu Suspensionscolloiden.

Es ist nun zu vermuthen, dass entweder die Stellung der chromophoren Azobindung zur auxochromen Amido- oder Hydroxylgruppe am Naphthalinring oder Zahl und Stellung der Sulfosäuregruppen von Einfluss auf den Colloidgehalt der Farben ist.

Um weitschweifige Erörterungen zu vermeiden, nehme ich voraus, dass — soweit mein Material ein bestimmtes Urtheil zulässt — der Grundcharakter des Colloidzustandes bedingt ist durch das Verhältniss chromophore : auxochrome Gruppe¹⁾.

Diese Behauptung wäre durch Ausschaltung der anderen möglichen Bedingung zu beweisen.

Durch eine Erhöhung der Zahl der SO_3Na -Gruppen wird der Colloidgehalt nicht principiell geändert:

Benzopurpurin B (Tab. V, 1) mit 2 SO_3Na ,

Brillantcongo G (Tab. V, 2) und R (Tab. V, 3) mit 3 SO_3Na ,

Trypanroth (Tab. V, 4) mit 5 SO_3Na

bleiben hydrophile Colloide und färben alle vital. Von Einfluss ist aber diese erhöhte Zahl der SO_3Na -Gruppen dennoch. Je mehr dieser Gruppen im Molecül enthalten sind, desto stärker ist der Farbstoff in seiner Lösung dissociirt. Damit wird seine Neigung zur Gelbildung zurückgedrängt, was für die vitalfärbenden Eigenschaften der Farben bis zu einem gewissen Grade von Vortheil ist. Der

1) Es muss hier kurz die Theorie entwickelt werden, die den Charakter einer Substanz als Farbstoff zu erklären sucht.

Bei einem Farbstoff haben wir zu unterscheiden:

1. Chromophore, d. h. Atomgruppen, deren Einführung in ein farbloses Molecül dieses zu einem

2. Chromogen macht. Diese Verbindung bleibt farblos und wird erst farbig durch Eintritt der

3. auxochromen Gruppen, die durch ihren Einfluss auf das Chromophor der Verbindung Farbstoffcharakter verleihen. Sie können

a) bathochrom, d. h. farbvertiefend,

b) hypsochrom, d. h. farberhöhend wirken.

Am Benzopurpurin B durchgeführt, sind die Azobindungen — $\text{N}=\text{N}$ — die Chromophore; folgendes Gerüst

Treten nun die auxochromen Amido-(— NH_2)-gruppen in das Chromogen ein, so entsteht durch ihren Einfluss auf die Chromophore der Farbcharakter der Verbindung.

Ueber die Wirkungsweise der SO_3Na -Gruppen werden wir später Näheres hören.

Genauerer siehe bei Ley, Nietzky, Georgewitsch, Kaufmann, Witt u. A., dort auch Literatur.

Grundcharakter eines hydrophilen Colloides wird hierdurch nicht geändert. Vollständige Ausschaltung der SO_3Na -Gruppen war nicht möglich, da unsere Farben hierdurch unlöslich und nicht mehr anwendbar werden.

Ehe wir uns weiterhin mit dem Einfluss der Zahl der SO_3Na -Gruppen beschäftigen, wird der Einfluss der Stellung zu behandeln sein.

Die Benzopurpurinreihe (Tab. V) enthielt stets je 1 SO_3Na -Gruppe an C_6 .

Im Diaminroth 3 B (Tab. VI, 3) dagegen ist die SO_3Na -Gruppe von C_6 (im Benzopurpurin B) nach C_7 gerückt. Damit ist der Farbstoff schwerer löslich geworden, aber ein hydrophiles Colloid geblieben. In Folge dessen neigt das Diaminroth 3 B sehr stark zur Hydrogelbildung, eine für die Vitalfärbung hinderliche Eigenschaft. Man muss daher mit schwachen Lösungen arbeiten. Deshalb gelang es mir, hier noch nicht zu einheitlichen Resultaten in Bezug auf Färbungsvermögen zu kommen. Ebenso verhält sich Hessisch Purpur N (Tab. VI, 4), das keine SO_3Na -Gruppen mehr in den Naphtalinringen enthält. Erhöhung der Zahl der SO_3Na -Gruppen (ohne C_6 zu besetzen) wird wohl Diaminroth 3 B und Hessisch Purpur N zu Vitalfarben machen. Das deuten exakt Vitalneuroorange (Tab. VI, 1) und Vitalneuroth (Tab. VI, 2) an. In beiden Farben ist C_9 frei. Vitalneuroorange enthält SO_3Na an C_5 , Vitalneuroth die Sulfosäuregruppe an C_7 . Beide Substanzen färben vital!

Diese Thatsache lässt sich auch an negativen Farben umgekehrt erweisen. Das Diaminschwarz RO (Tab. VII, 3) ist ein nicht vitalfärbendes, elektrolytempfindliches Suspensionscolloid. In Farbe No. 150 (Tab. VII, 4) ist noch eine SO_3Na -Gruppe eingeführt. Die Substanz ist weit leichter löslich geworden, färbt aber trotzdem nicht vital. Der Grundcharakter ist also auch hier nicht geändert. Im Gegensatz hierzu enthält Chicagoblau R (T VII, 1) die Azobindung, Hydroxyl- und Amidogruppe in einer für die Vitalfärbung geeigneten Gruppierung, ist aber durch Zahl und Stellung der SO_3Na -Gruppen gehindert, vital zu färben. Erhöhung der Zahl und günstigere Stellung der SO_3Na -Gruppen lässt das Chicagoblau R als Trypanblau (Tab. VII, 2) zur Vitalfarbe werden.

Wie weit kann man nun in der Verbesserung der Löslichkeit gehen? Auch hier sind uns Grenzen gezogen. Tabelle VIII enthält fünf nach ihrer Löslichkeit geordnete Farben. Diaminroth 3 B (Tab. VIII, 1) giebt keine oder nur unsichere Resultate. Benzopurpurin B (Tab. VIII, 2) färbt in frischer dünner Lösung vital. Trypanroth (Tab. VIII, 3) verhält sich ähnlich wie die Ausgangsfarbe der Untersuchungen — das Trypanblau (Tab. IX, 1). Vitalneuroorange (Tab. VIII, 4) färbt auch noch gut, doch tritt die Färbung schneller ein und verblasst wieder nach einigen Tagen. Farbe No. 185 (Tab. VIII, 5) färbt sehr schnell vital, wird auch abgelagert, dann aber wieder sehr schnell ausgeschieden. Noch weitere Erhöhung der Löslichkeit würde demnach wohl ein Ueberwiegen der Ausscheidungsschnelligkeit über die Tendenz zur Ablagerung zur Folge haben.

Auf die Consequenzen dieser Thatsache für die Chemotherapie werde ich später zu sprechen kommen.

Nachdem wir auf diese Weise einige Anhaltspunkte über chemische Constitution, physiko-chemischen Lösungscharakter und Vitalfärbungsvermögen gewonnen haben, wollen wir versuchen, etwas über die Functionsart des Chemoceptors des Trypanblaus (Tab. IX, 1) zu ermitteln. Aus den auf Tabelle IX zusammengestellten Farben können wir — unter Berücksichtigung der früheren Befunde — einige Schlüsse ziehen.

Diaminviolett N (Tab. I, 3) unterscheidet sich vom Benzopurpurin B (Tab. I, 1) durch Eintritt zweier Hydroxylgruppen. Das vitalfärbende hydrophil-colloide Benzopurpurin B wird hierdurch zum nicht mehr vitalfärbenden Diaminviolett N. Bringt man jedoch die Amido- und Hydroxylgruppe zu einander und zur Azobindung in eine für den Colloidcharakter geeignete Stellung und regulirt durch Zahl und Stellung der SO_3Na -Gruppen passend die Löslichkeit, so kommt man zum Trypanblau (Tab. IX, 1). Von diesem gelangt man rückwärts über das vitalfärbende Diaminschwarz BH (Tab. IX, 2) zur negativen Farbe No. 150 (Tab. IX, 3). Letztere färbt nicht vital, obwohl ihre Löslichkeit so eingestellt wurde, dass sie etwa der des Trypanblaus entspricht.

Die Stellungsumkehr von $-\text{OH}$ und $-\text{NH}_2$ zur chromophoren Bindung in Farbe No. 153 (Tab. IX, 4) lässt die vitalfärbenden Qualitäten des Trypanblaus verschwinden. Dabei ist nur noch eine Verschiebung der Stellung je einer SO_3Na -Gruppe von C_3 nach C_4 vorgekommen, wodurch die Löslichkeit kaum beeinträchtigt ist, wie man sich durch einen Versuch leicht überzeugen kann. Ebenso färbt Farbe No. 154 (Tab. IX, 5), welche die Hydroxylgruppen auf der einen, die Amidogruppe auf der anderen Seite enthält, nicht mehr vital. Hierzu ist noch auf die Besprechung der Tabelle IV zu verweisen. Baumwollcorinth B (Tab. IX, 7) endlich enthält die negativen Seiten des Benzopurpurins 4 B (Tab. I, 2) und des Azoblaus (Tab. I, 6) und färbt entsprechend nicht mehr vital.

Von Interesse ist es, einige Thatsachen über das Schicksal der nicht vitalfärbenden Substanzen mitzuthemen. Injicirt man z. B. Farbe No. 150 (Tab. IX, 3, Farbe No. 153 (Tab. IX, 4 oder Farbe No. 154 (Tab. IX, 5) in wässriger 1proc. Lösung intraperitoneal, so wird nahezu nichts resorbirt; am folgenden Tage ist das Thier schwer krank. Genaue Messungen der Peritonealflüssigkeit ergaben ein reichliches Exsudat in der Bauchhöhle. Der Versuch durch intravenöse Injection zum Ziele zu kommen, scheiterte ebenfalls, ja sie wirkte in kurzer Zeit tödtlich. Bei der Section intraperitoneal injicirter Thiere waren mir bereits reichliche Farbniederschläge auf dem gesammten Peritoneum aufgefallen, was wohl sicher mit der Elektrolytempfindlichkeit suspensionscolloider Lösungen in Einklang steht. Den Tod der intravenös injicirten Thiere hatte offenbar Embolie der Lungengefäße durch solche Niederschläge hervorgerufen. Bei der Section war das Blutgefäßssystem sehr stark gefüllt; Milz, Leber, Niere zeigten sich sehr voluminös und weich. Die Lungen waren vollständig von Infarkten durchsetzt. Einmal fand sich auch eine Embolie

der Herzmuskelgefäße. Bei hier nicht citirten Farben gelang auch der mikroskopische Nachweis solcher Emboli.

Versuche mit dem Oxaminviolett

Oxaminviolett = Natriumsalz der Benzydindisazobi-2-Amido-5-naphtol-7-sulfosäure.

sind recht geeignet, zu zeigen, wie wichtig die histologische Untersuchung des ganzen Thieres ist und wie sehr man auf mögliche Fehler achten muss. Nach unseren Erfahrungen konnte das Oxaminblau nicht vital färben. In Folge seiner schweren Löslichkeit in Wasser konnte ich nur sehr schwache Lösungen anwenden. Die Injectionen erfolgten daher 3 Monate hindurch und wurden anscheinend ganz gut vertragen. Obwohl die durch Punction gewonnenen Makrophagen der Peritonealflüssigkeit (siehe hierüber bei Goldmann und Schulemann) stets scheinbar sehr schöne Vitalfärbung zeigten, färbten sich die Thiere nicht vollständig vital. Bei der Section enthielt stets nur das Netz diese Färbung. Nach den Befunden an Farbe No. 150 (Tab. IX, 3) u.s.w. kann kein Zweifel mehr sein, dass es sich um phagocytirte Niederschläge handelte. Ueber das Verhältniss von Phagocytose zu Vitalfärbung geben die oben genannten Arbeiten gleichfalls Auskunft. Falsch jedoch wäre es jede Vitalfärbung als Phagocytose aufzufassen, da gerade die Vitalfarben nicht zur Niederschlagsbildung tendiren und wir schon früher festgestellt haben, dass Vitalfärbung und Phagocytose nicht identisch sind.

Zu erwähnen wäre noch kurz der Einfluss der Applicationsart auf die Färbung. Die schönste und gleichmässigste Färbung erhält man bei intravenöser Injection. Diese ist bei den Trypanfarben sehr wohl möglich, entgegen der Behauptung Zaretsky's. Ich habe niemals Embolie gesehen und muss vermuten, dass er bei seinen Versuchen vom Isaminblau auf unsere Farben geschlossen hat, ohne auch Trypanblau u.s.w. daraufhin zu prüfen. Injicirt man intraperitoneal, so scheint die Leber einen grossen Theil der Farbmengen abzufangen und erst durch mehrere Injectionen treibt man die Färbung im übrigen Körper hoch. Das ist nun nicht so aufzufassen, als ob die Leber die ersten Färbungen vollständig absorbire. Ein grosser Theil kommt auch schon bei der ersten Injection in den Körper. Nur ist die Färbung durch eine intravenöse Injection sofort viel gleichmässiger und tiefer als bei einer intraperitonealen Injection der äquivalenten Menge. Bei intravenöser Application tritt ferner die Färbung schon während der Injection ein, bei intraperitonealer erst nach einiger Zeit. Subcutane Injection verzögert die Schnelligkeit der Färbung noch mehr. Ueber Diffusibilität und Färbungseintritt, sowie Farbabscheidung habe ich bereits gesprochen.

Diese letzten Thatsachen scheinen mir im Hinblick auf die heutzutage so lebhaft discutierte Frage der Applicationsart von besonderem Interesse.

Soweit unser vorliegendes Material ausreicht, scheinen mir folgende Schlüsse einige Berechtigung zu haben:

Der physiko-chemische Charakter einer Substanz ist abhängig von der chemischen Constitution. Er ist in erster Reihe eine Function von Chromophor zu Auxochrom, das der Farbe den physiko-chemischen Grundcharacter verleiht.

Es ist zu bedenken, dass starke Herabsetzung der Moleculargrösse diese Beobachtung modificiren wird, und dass ferner noch Structuränderungen des Chromogens von Einfluss sind, worauf ich noch nicht eingegangen bin.

Soweit wir den physiko-chemischen Charakter der Verbindungen kennen, sind es hydrophile Colloide mit Annäherung an echte Lösungen, die vitalfärbend wirken können.

Nicht zu vergessen sind die in der Natur überall vorhandenen Uebergänge. So wird wohl auch noch das eine oder andere Suspensionscolloid vital färben. Eine Vermuthung, die mir Hoeber's Resultate an der Froschniere zu bestätigen scheinen.

Verfolgen wir den Weg des im Serum gelösten Farbstoffes, so werden wir vor die Frage gestellt: Wie gelangt die Farbe in die Zelle? Das bedeutet aber nichts anderes als die Behandlung des Problems vom Bau der Zellmembran. Trotz der vielen interessanten Arbeiten, die hierüber existiren, ist es noch nicht möglich, sich eine klare Vorstellung zu machen. Auch durch die Vitalfärbung ist man zu einheitlichen Resultaten nicht gekommen. Ja, man sucht das durch Hoeber's Untersuchungen aufgefundene Verhalten der Nierenepithelien als einen Akt „physiologischer Permeabilität“ zu erklären — oder besser zu benennen. Auf die Discussion dieses Problems werde ich nicht eingehen, zumal mein Material diesbezügliche Schlüsse nicht zulässt. Von Wichtigkeit für uns ist, ob die Möglichkeit der Färbung an den möglichen Durchtritt durch die hypothetische Zellmembran gebunden ist oder ob der Eintritt der Färbung vom „inneren Milieu“ der Zelle abhängt.

Unsere Farbstoffe sind als Sulfosäurefarben sämtlich lipoidunlöslich. Versuche mit den Ruhlandschen Terpentinöl-Cholesterin- und Lecithinlösungen bewiesen dies durch ihren negativen Ausfall aufs Neue. Wir können demnach wohl mit Sicherheit sagen, dass die Farben nicht in Zellen mit exquisiter Lipoidmembran z. B. Erythrocyten und Nervenzellen gelangen können.

Beobachtungen am Epithelkörper, Hypophyse, Nebenniere einerseits, Lebercapillarendothelien, Makrophagen, Nierenkanälchen andererseits beweisen, dass für den Eintritt der Vitalfärbung das „innere Milieu“ massgebend ist. In beiden Kategorien von Organen ist die Farbe in verschiedener Weise abgelagert. Die Epithelien der Parathyreoidea zeigen feine hellblaue Granula, die Makrophagen, vitalfärbbaren Bindegewebs-

zellen etc. enthalten das Trypanblau in dichten schwarzblauen Klumpen (Abbildungen siehe bei Schulemann, Arch. mikr. Anat. Bd. 79). Diese Verhältnisse finden sich an der Niere (Abbildungen ebenda) wieder. Für die Kaninchen- und Mäuseniere konnte ich die gleichen Befunde erheben. Wer diese Bilder gesehen hat, wird keinen Augenblick darüber im Zweifel sein, dass die Bedingungen der Ablagerung in beiden Fällen ganz verschiedene sind. Ein Beweis, dass die Farben in alle möglichen Zellen gelangen, aber nur dort gut abgelagert werden, wo sie geeignete Bedingungen finden.

In den nach unserem Sinne vital färbbaren Zellen werden die Farben in Granulaform abgelagert. Die Betrachtung dieser Frage führt uns wiederum auf ein höchst strittiges Gebiet, das gerade in letzter Zeit die allerausgiebigste Bearbeitung erfährt und die widersprechendsten Resultate zu Tage gefördert hat — die Frage nach der Natur der Zellgranula. Der weiteren Besprechung will ich gleich vorausschicken, dass das im Folgenden zu Sagende nur für unsere Farben gilt und stets nur Gleichwerthiges mit Recht verglichen werden kann. Jedenfalls erscheint mir der Vergleich der eosinophilen Leukocytengranula mit den durch Trypanblau erzeugten Granulationen durch nichts gerechtfertigt

Wir werden nun festzustellen suchen, ob die Farbablagerung nach physikalischen, chemischen oder physiko-chemischen Gesetzen in den nach Goldmann vital färbbaren Zellen vor sich geht. Dies zu entscheiden, verwendete ich Trypanblau und Vitalneuroth combinirt. Ich injicirte Mäusen am ersten Tage 0,5 ccm der 1 proc. Lösung der einen Farbe, am zweiten Tage liess ich eine Injection der gleichen Menge der anderen Farbe folgen und untersuchte die Thiere am dritten Tag. Das Protoplasma jeder färbbaren Zelle enthielt rothe und blaue Granula nebeneinander. Das spricht für chemische Reaction, sonst müssten violette Granula auftreten. Betrachten wir nämlich die — auch von unseren Farben — tingirten elastischen Fasern der Gefässwände etc., so erscheinen diese bei Combinationsversuchen violett. Diese Färbung der elastischen Fasern ist wohl auf Adsorption zurückzuführen. Sichere Adsorption beobachtet man an Baumwollfasern. Sie verhalten sich, wie dementsprechende Versuche zeigten, ganz ähnlich den elastischen Fasern. Combinationsfärbung an Baumwolle gleicht auch im mikroskopischen Bilde der Elasticafärbung im Thier. Den oben genannten Combinationsversuchen könnte man den Einwand machen, dass in der Zeit von einem Tage neue Granula gebildet worden seien und doch Adsorption vorliege. Diese Anschauung widerlegt folgender Versuch. Ich injicirte eine Maus in einer Sitzung mit 1 ccm Vitalneurothlösung, Trypanblaulösung $\bar{a}\bar{a}$ und erhielt wiederum rothe und blaue Granula nebeneinander. Dieses Ergebniss verdient besondere Beachtung, da es scheinen könnte, als ob die roth- und blaufärbbaren Granula von verschiedener Natur wären.

Färbt man Thiere allein mit Vitalneuroth oder allein mit Trypanblau, so bemerkt man, dass mit ersterer Farbe viel schneller die Vitalfärbung eintritt als mit letzterer. Der Grund ist darin zu suchen, dass Vital-

neuroth weit diffusibler als Trypanblau ist, worüber einige physikalische Versuche Aufschluss geben. Bei gleichzeitiger Injection muss man die Wirkung der Farben in folgenden Phasen annehmen:

- ✂ I. Vitalneurothwirkung: rothe Granula.
- II. Vitalneuroth-Trypanblauwirkung: violette Granula.
- ↓ III. Trypanblauwirkung: blaue Granula.

Selbst bei Annahme extrem-chemischer Bedingungen müssen wir bei Phase II violette Granula erhalten, da nicht ein Granulum einem Farbmolekül entsprechen kann. Leider ist das Blau so dunkel, dass man violette Granula nicht mit Sicherheit auffinden kann. Feststellen lässt sich jedoch, dass die Zahl der rothen Granula abgenommen hat gegenüber ihrer Zahl bei Combinationspräparaten nach dem früheren zweizeitigen Modus. Ueber weitere Combinationsversuche mit anderen Farben werde ich später berichten.

Aus den vorliegenden Versuchen scheint mir hervorzugehen, dass die Granula erst durch den Eintritt der Farben in die Zellen gebildet werden und eine chemische Verbindung der Farben mit dem hypothetischen Reaktionskörper darstellen.

Diese Hypothese stützt sich noch auf folgende Thatsachen:

Beim Hochtreiben einer Maus in der vitalen Färbung vermehrt sich nur die Zahl der Granula und nicht die Intensität der Färbung des einzelnen Granulums. Injicirt man einer Maus in einer Sitzung 2 cem 1 proc. Trypanblaulösung, so geht das Thier zu Grunde; durch aufeinanderfolgende Injectionen vermag man einem Thier in zwei Monaten 16 cem und selbst noch mehr Farblösung einzuverleiben. Offenbar entstehen in den injectionsfreien Pausen immer wieder neue Mengen des Reaktionskörpers, der die Farben bindet.

Die Form der Granula ist ebenfalls nicht constant und hängt — soweit ich dies bis jetzt entscheiden kann — von der Diffusionsgeschwindigkeit der Farbstoffe ab. Je langsamer diese diffundiren, desto feiner und gleichmässiger werden die Granula (Isaminblau). Das schneller diffundirende Trypanblau giebt unregelmässige, klumpige Granula und mit dem noch schneller diffusiblen Vitalneuroth erhielt ich sogar sehr grosse Granula von viereckiger Form. Das sind alles Thatsachen, die auf chemische Reactionen deuten. Den Vorwurf, dass die Färbung „Kunstproducte“ schaffe, glaube ich abweisen zu müssen. Aus der Form der Granula ziehen wir keine Schlüsse, sondern betrachten allein das Entstehen derselben als eine histochemische oder biochemische Reaction, die uns die Anwesenheit des Reaktionskörpers anzeigt.

Dass eine physiko-chemische Reaction — eine Ausflockung der colloiden Farblösungen durch in der Zelle enthaltene Elektrolyte — nicht stattfindet, scheint mir aus dem früher untersuchten Colloidcharakter der Vitalfarben hervorzugehen.

Genauere Betrachtung verdient noch der Reaktionskörper — seine Existenz, sein Bau und der Reaktionsmodus desselben.

Für seine Existenz sprechen die schon oben betrachteten Thatsachen:

1. Der Ausfall der Combinationsversuche.
2. Sein Fehlen in Zellen, die trotz Eindringens der Farben in das Protoplasma keine eigentliche Vitalfärbung geben (Epithelkörper etc.).
3. Die Abhängigkeit von Granulaform und Diffusionsgeschwindigkeit der Farben.
4. Die Möglichkeit, die Thiere durch mehrere Injectionen „hochzutreiben“.

Hierzu kommt ferner:

5. Wird ein vital gefärbtes Thier tragend, so verblasst die allgemeine Färbung des Körpers. Der Farbstoff wandert zum Uterus, der eine tiefdunkle Färbung annimmt (Näheres siehe bei Goldmann). Das ist nur so zu erklären, dass der Reaktionskörper in Lösung geht und am Uterus wieder abgelagert wird. Die dabei frei gewordene Farbe, diffundirt aus den Zellen und verbindet sich von Neuem mit dem inzwischen abgelagerten Reaktionskörper.

6. Entstehen in den vital gefärbten Zellen Gifte irgendwelcher Art, die den Reaktionskörper zerstören, dann diffundirt der freigewordene Körper aus der Zelle. Auch diese Thatsache ist von Goldmann festgestellt. Aehnliche Ergebnisse hatte ich in eigenen Versuchen.

Auch von dem Bau des Reaktionskörpers vermögen wir uns nach den Versuchen Goldmann's ein Bild zu machen. Nach seinen Versuchen ist der Reaktionskörper eine lockere Fett-Eiweiss-Verbindung. (Hierüber siehe genauer: Goldmann, Neue Untersuchungen über die äussere und innere Secretion des gesunden und kranken Organismus im Lichte der vitalen Färbung. Kapitel XI, 2. Ueber die Wanderung von gewebusbildenden Nährstoffen. Bruns' Beiträge z. klin. Chirurgie. März 1912.) So erscheint es verständlich, dass meine Versuche „Vitalgranula“ aus Farbe + Eiweiss im Reagensglas darzustellen, nie gelangen, obwohl ich die verschiedensten Eiweisskörper verwendete.

Um über den Reaktionsmodus etwas aussagen zu können, muss ich eine allgemeine Betrachtung über die Chemoceptoren vorausschicken. Tabelle X zeigt fünf Diaminfarben mit verschiedenen „Chemoceptoren“, welche alle die Farben in den gleichen Zellen, mit dem gleichen Reaktionskörper binden. Ebenso wirken Isaminblau — eine Triphenylmethansulfosäure — und Lithion-Carmin-Ribbert — wohl vom Methyl-Dioxy- α -Naphthochinon abzuleiten. Versuche mit Verwandten dieser Farben sind im Gange und deuten daraufhin, dass das Verhältniss Auxochrom: Chromophor nicht nur den physiko-chemischen Grundzustand, sondern auch die Ablagerungsreaction bedingt.

Man könnte demnach daran denken, dass die Vitalgranula **Farblacke** darstellen. Diese Lacke werden neuerdings — in Uebereinstimmung mit der Theorie von A. Werner (Zürich) über Nebenvalenzen und Raum-Isomerie complexer Kobaltverbindungen — als complexe Verbindungen aufgefasst. Es bestehen soviel interessante Beziehungen, dass dieser Vergleich sehr verlockend erscheint und ich wenigstens darauf hingewiesen haben möchte.

Zusammenfassend glaube ich von den Chemoceptoren unserer Farben sagen zu können, dass sie alle in der gleichen Weise intramolecular wirkend einerseits den physiko-chemischen Grundcharakter bedingen und ferner maassgebend sind für das Entstehen der Verbindung zwischen Farbe und Reaktionskörper.

Auf weitere Theorien will ich mich — obwohl die Versuchung gross ist — nicht einlassen.

Am Schlusse dieser Zeilen erlaube ich mir, Herrn Geheimrath Küttner für das stete liebenswürdige Interesse, das er an dieser Arbeit nahm, sowie für die Förderung derselben durch Ueberlassung des Materials, meines ergebensten Dankes zu versichern. Diesen schulde ich auch den Herren Professoren Gadamer und Röhmann für oft ertheilten Rath und Anregung.

Zu danken habe ich ferner den verschiedenen Farbwerken für Ueberlassung von Farbstoffen. Ganz besonders war es hier Herr Dr. Hollborn, Inhaber der Firma Dr. G. Grübler & Co. (Leipzig), der mich mit Farbmateriale in der freigebigsten, verständnissvollsten Weise unterstützte.

Die in dieser Arbeit genannten Farbstoffe sind fast sämmtlich bei der Firma Dr. G. Grübler & Co. (Leipzig) in geeigneter Beschaffenheit erhältlich.

Da das Erscheinen dieser Arbeit sich um nahezu 3 Monate verzögert hat, bin ich in der Lage gewesen eine grosse Zahl neuer — oft besonders für diesen Zweck dargestellter — Farbstoffe inzwischen zu untersuchen. Manche speciellen Punkte haben eine Modification nöthig, stets aber hat sich von Neuem meine Anschauung bestätigt, dass die Wirkungsweise der Chemoceptoren keine rein chemische, sondern eine physiko-chemische zu sein scheint. Weiteres über dieses Thema wird im Archiv der Pharmacie, herausgegeben von E. Schmidt und Beckurts, erscheinen.

Tabelle I.

- 1) **Benzopurpurin B.**
- 2) **Benzopurpurin 4B** = Natriumsalz der o-Tolidin-disazo-bi- α -Naphthylamin-4-sulfosäure.
- 3) **Diaminviolett N.**
- 4) **Dianilblau 4R** = Natriumsalz der Ben-zidin-disazo-1,8-Di-oxynaphthalin-3,6-disulfosäure - β -Naphthol-6-sulfo-säure.
- 5) **Dianilblau 2 R** = Natriumsalz der o-Tolidin-disazo-1,8-Dioxynaphthalin-3,6-disulfosäure - α -naphthol-4-sulfo-säure.
- 6) **Azoblau** = Natrium-salz der o-Tolidin-disazo-bi- α -Naphthol-4-sulfosäure.

Tabelle II.

Tabelle III.

Tabelle IV.

- 1) **Diaminblau 2B.**
- 2) **Diaminschwarz BH.**
- 3) **Diaminviolett N.**
- 4) **Dianilblau R.**
- 5) **Dianilblau 2R.**
- 6) **Azoblan.**
- 7) **Dianilblau 4R.**

Tabelle V.

- 1) **Benzopurpurin B** = Natriumsalz der o-Tolidin-disazo-bi- β -Naphthylamin-6-sulfosäure.
- 2) **Brillant-Congo-R** = Natriumsalz der o-Tolidin-disazo- β -Naphthylamin-3,6-disulfosäure - β -Naphthylamin-6-sulfosäure.
- 3) **Brillant-Congo-G** = Natriumsalz der Benzidin-disazo- β -Naphthylamin-3,6-disulfosäure - β -Naphthylamin-6-sulfosäure.
- 4) **Trypanroth** = Natriumsalz der Benzidin-monosulfosäure-disazo-bi- β -Naphthylamin-3,6-disulfosäure.

Tabelle VI.

- 1) **Vitalneuorange** = Para-para-Diamido-diphenylharnstoff-meta-metá-disulfosäure-disazo-bi- β -Naphthylamin-5-sulfosäure.
- 2) **Vital-neuroth.**
- 3) **Diaminroth 3 B** = Natriumsalz der o-Tolidin-disazo-bi- β -Naphthylamin-7-sulfosäure.
- 4) **Hessisch Purpur N** = Natriumsalz der Stilben-disulfosäure-disazo-bi- β -Naphthylamin.

Tabelle VII.

- 1) **Chicago Blue R** = Natriumsalz der o-Tolidin-disazobi-1,8-Amido-naphthol-4-sulfosäure.
- 2) **Trypan Blue.**
- 3) **Diamine Schwarz R0** = Natriumsalz d. Benzidin-disazobi-2-Amido-8-naphthol-6-sulfosäure.
- 4) **Farbe No. 150.**

Tabelle VIII.

- 1) **Diaminroth 3 B.**
- 2) **Benzopurpurin B.**
- 3) **Trypanroth.**
- 4) **Vitalneuroorange** = Natriumsalz der Para-para-diamido-diphenylharnstoff-metá-metá-disulfosäure-disazobi-β-naphthylamin-5-sulfosäure.
- 5) **Farbe No. 185** = Natriumsalz der Para-para-diamido-diphenylharnstoff-metá-metá-disulfosäure-disazobi-β-naphthylamin-5-disulfosäure.

Tabelle IX.

- 1) **Trypanblau** = Natriumsalz der o-Tolidin-disazo-bi-1,8-Amidonaphthol-3,6-disulfosäure, alkalisch gekuppelt.
- 2) **Diaminschwarz BH** = Natriumsalz der Benzidin-disazo-1,8-Amidonaphthol-3,6-disulfosäure-2-Amido-8-naphthol-6-sulfosäure, alk. gek.
- 3) **Farbe No. 150** = Natriumsalz der Benzidinmonosulfosäure-disazo-bi-2-Amido-8-naphthol-6-sulfosäure.
- 4) **Farbe No. 153** = Natriumsalz der ortho-Tolidin-disazo-bi-1,8-Amidonaphthol-4,6-disulfosäure, sauer gekuppelt.
- 5) **Farbe No. 154** = Natriumsalz der o-Tolidin-disazo-1,8-Dioxynaphthalin-3,6-disulfosäure-1,8-Diamido-naphthalin-4-sulfosäure.
- 6) **Diaminviolett N** = Natriumsalz der Benzidin-disazo-bi-2-Amido-8-naphthol-6-sulfosäure.
- 7) **Baumwollcorinth B** = Natriumsalz der o-Tolidin-disazo-α-Naphthylamin-4-sulfosäure-α-Naphthol-4-sulfosäure.
- 8) **Salvarsan** = Dioxidiamidoarsenobenzoldichlorhydrat + 2 Mol. Krystallwasser.

Tabelle X.

- 1) **Benzopurpurin B.**
- 2) **Dianilblau R =** Natriumsalz der o-Tolidin-disazo-bi-1,8-Dioxynaphthalin-3,6-disulfosäure.
- 3) **Vitalneuroth =** Natriumsalz der Parapará-Diamido-diphenyl-harnstoff-meta-metá-disulfosäure-disazo-bi-Methyl-β-naphthylamin-7-sulfosäure.
- 4) **Vitalneugelb =** Natriumsalz der Parapará-Diamido-diphenyl-harnstoff-meta-metá-methyl-disazo-bi-naphthalin-1,5-disulfosäure.
- 5) **Trypanblau.**

Literatur.

- 1a. Abelin, Ueber eine neue Methode das Salvarsan nachzuweisen. Münch. med. Wochenschr. 1911. No. 19.
- 1b. Abelin, Salvarsan im Blut bei intravenöser Injection. Münch. med. Wochenschr. 1912. No. 2.
2. N. Andreew, Ueber die vitale metachromatische Färbung mit Sulforhodamin. Virchow's Archiv. 1911. Bd. 204.
3. Derselbe, Ueber die patholog.-anatomischen Veränderungen einiger Organe nach Vergiftung mit verschiedenen chemotherapeutischen Substanzen. Virchow's Archiv. 1911. Bd. 205.
4. Arnold, bei Goldmann und Schulemann citirt.
5. Aschoff, Ehrlich's Seitenkettentheorie und ihre Anwendung auf die künstlichen Immunisirungsprocesse. Sammelreferat. Zeitschr. f. allg. Physiol. 1902. Bd. 1.
6. Bechhold, Die Colloide in Biologie und Medicin. Dresden 1912.
7. Benda, Aromatische Arsinsäuren. Berichte d. deutschen chem. Gesellsch. 1908. Bd. 41. S. 2367.
8. Benda und Kahn, Homologe und Derivate der Arsanilsäure. I. Mitth. Ebenda. 1908. Bd. 41. S. 1672.
9. Benda, o-Amino-aryl-Arsinsäuren. Ebenda. 1909. Bd. 42. S. 3619.

10. Benda, Ueber die p-Nitranilin-Arsinsäure. Ebenda. 1911. Bd. 44. S. 3293.
11. Derselbe, Ueber p-Phenylendiaminsäure. Ebenda. 1911. Bd. 44. S. 3300.
12. Derselbe, o-Aminophenylarsinsäure (o-Arsanilsäure). Ebenda. 1911. Bd. 44. S. 3304.
13. Benda und Bertheim, Ueber Nitro-Oxy-Arylarsinsäuren. Ebenda. Bd. 44. S. 3445.
14. Benda, Ueber Nitro-Oxy-Phenylarsinsäure ($\text{AsO}_3\text{H}_2 : \text{NO}_2 : \text{OH} = 1 : 3 : 4$). Ebenda. 1911. Bd. 44. S. 3449.
15. Derselbe, Ueber die 4 Amino-3 Oxyphenyl-1 Arsinsäure und ihre Reductionsproducte. Ebenda. 1911. Bd. 44. S. 3578.
16. Derselbe, Ueber Nitrirung des Arsanils. Ebenda. 1912. Bd. 45. S. 53.
17. Bernthsen, Organische Chemie. X. Aufl. Braunschweig 1909.
18. Bertheim, Diazophenylarsinsäure und ihre Umwandlungsproducte. Berichte d. deutschen chem. Gesellsch. 1908. Bd. 41. S. 1853.
19. Derselbe, Isomere (m- oder o-)Aminophenylarsinsäure. Ebenda. 1908. Bd. 41. S. 1655.
20. Derselbe, Halogenirte p-Aminophenylarsinsäuren. Ebenda. 1910. Bd. 43. S. 529.
21. Bertheim und Benda, Die Constitution der isomeren Amino-Phenyl-Arsinsäure und der Michaelis'schen Nitrophenylarsinsäure. Ebenda. 1911. Bd. 44. S. 3297.
22. Bertheim, Nitro- und Aminoarsanilsäure. Ebenda. 1911. Bd. 44. S. 3092.
23. Bouffard, Injection des couleurs de Benzidine. Annal. de l'Inst. Pasteur. 1906. T. XX. No. 6.
24. Carl H. Browning, Journ. of Path. and Bact. 1908. Vol. XII. p. 181.
25. Bucherer, Die Theerfarbenchemie zu Beginn des 20. Jahrhunderts. Zeitschr. f. angew. Chemie. 1904. Bd. XVII. S. 1841.
26. Derselbe, Ueber die quantitative Bestimmung von Amido- und Hydroxylverbindungen der Benzol- und Naphtalinreihe. Ebenda. 1907. Bd. XX. S. 865.
27. Chaussy, Ueber Stereoisomerie bei Dichloräthylendiamincobaltisalen. Inaug.-Dissert. Zürich 1909.
28. P. Ehrlich, Das Sauerstoff-Bedürfniss des Organismus. Berlin 1885.
29. Derselbe, Therapeut. Monatsh. 1887. März.
30. Derselbe, Constitution, Vertheilung und Wirkung chemischer Körper. Leipzig 1893.
31. Derselbe, Ueber die Beziehungen von chemischer Constitution, Vertheilung und pharmakologischer Wirkung. Internat. Beitr. z. inneren Medicin. Festschrift für v. Leyden. 1902. Bd. 1.
32. Derselbe, Beziehung von chemischer Constitution, Vertheilung und pharmakologischer Wirkung. Gesammelte Arbeiten zur Immunitätsforschung. Berlin 1904.
33. Derselbe, Ueber den jetzigen Stand der Chemotherapie. Berichte d. deutschen chem. Gesellsch. 1909. Bd. 42. S. 17.
34. P. Ehrlich und Bertheim, Ebenda. 1907. Bd. 40. S. 3295.
35. Dieselben, Reductionsproducte der Arsanilsäure und ihre Derivate. (I. Mitth. p-Aminophenylarsenoxyd.) Ebenda. 1910. Bd. 43. S. 917.
36. Dieselben, Reductionsproducte der Arsanilsäure und ihrer Derivate. (II. Mitth. Ueber p-p'-Diaminoarsenobenzol.)
37. P. Ehrlich, Berl. klin. Wochenschr. 1907. No. 9—12.
38. Derselbe, Grundlagen und Erfahrungen der Chemotherapie. Stuttgart 1911.
39. Derselbe, Aus Theorie und Praxis der Chemotherapie. Leipzig 1911.
40. Derselbe, Vortrag auf der 83. Versammlung deutscher Naturforscher und Aerzte. Karlsruhe 1911.
41. Claudio Fermi, Sur le trypanosan, trypanrot, trypanblau et parafochsin dans l'immunisation de la rage. Centralbl. f. Bakt. 1909. Bd. 52. S. 574.
42. Fischel, bei Goldmann und Schulemann citirt.
43. Fischer, Fixirung, Färbung und Bau des Protoplasmas. Jena 1899.

44. Fränkel, Die Arzneimittelsynthese auf Grundlage der Beziehungen zwischen chemischem Aufbau und Wirkung. III. Aufl. Berlin 1912.
45. Friedberger und Masuda, Ueber den Einfluss des Salvarsans auf die Intensität der Antikörperbildung beim Kaninchen. Therap. Monatsh. 1911. H. 5. S. 288.
46. G. Otto Gabel, Das Salvarsan beim gerichtlichen Arsennachweis. Arch. d. Pharmazie. 1911. Bd. 249. S. 49.
47. Georgewitsch, Lehrbuch d. Farbchemie. III. Aufl. Leipzig und Wien.
48. E. E. Goldmann, Die äussere und innere Secretion des gesunden und kranken Organismus im Lichte der vitalen Färbung. Bruns' Beitr. z. klin. Chir. 1909.
49. Derselbe, desgl. Verh. d. deutschen pathol. Gesellsch. 14. Tagung. Erlangen 1910.
50. Derselbe, Studien zur Biologie der bösartigen Neubildungen. Bruns' Beitr. z. klin. Chirurgie. 1911.
51. Derselbe, Centralbl. f. Chirurgie. 1912. No. 1. S. 1.
52. Derselbe, Neue Untersuchungen über die äussere und innere Secretion des gesunden und kranken Organismus im Lichte der vitalen Färbung. Bruns' Beitr. z. klin. Chirurgie. 1912.
53. L. Graeper, Beobachtung von Wachsthumsvorgängen an Reihenaufnahmen lebender Hühnerembryonen nebst Bemerkungen zur vitalen Färbung. Archiv f. Entwicklungsmechanik d. Org. 1911. Bd. 33. S. 303.
54. R. Haller, Zur Kenntniss der Färbvorgänge. Cöthener Chemiker-Zeitung. 1912. Bd. 36. S. 169.
55. M. Heidenhain, Ueber chemische Umsetzung zwischen Eiweisskörpern und Anilinfarben. Pflüger's Archiv. 1902. Bd. 72.
56. Derselbe, Plasma und Zelle. Bd. 1. In Bardeleben's Handbuch der Anatomie des Menschen. Jena 1907.
57. R. Hoerber, Die physikalische Chemie der Zelle und der Gewebe. III. Aufl. Leipzig 1911.
58. R. Hoerber und Königsberg, Farbausscheidung durch die Nieren. Pflüger's Archiv. 1905. Bd. 108.
59. Kahn und Benda, Homologe und Derivate der Arsanilsäure. Berichte d. deutschen chemischen Gesellsch. 1908. Bd. 41. S. 3859.
60. Kaufmann, Ueber den Zusammenhang zwischen Farbe und Constitution. Ahrens' Sammlung. Bd. IX.
61. Lee und Mayer, Grundzüge der mikroskopischen Technik. III. Aufl. Berlin 1907.
62. C. Levaditi und E. v. Knaffl-Lenz, Mécanisme d'action de l'antimoine dans les trypanosomiasis. Zeitschr. f. Immunitätsforsch. und exp. Therapie. 1909. Bd. II. H. 5.
63. H. Ley, Ueber die Beziehungen zwischen Lichtabsorption und chemischer Constitution bei organischen Verbindungen. Zeitschr. f. angew. Chemie. 1907. Bd. XX. S. 1303.
64. Lunge, Chemisch-technische Untersuchungsmethoden. Bd. III. Gnehm. Organische Farbstoffe. V. Aufl. Berlin 1905.
65. Mamlock, Stereochemie. Leipzig 1907.
66. Masuda, Untersuchung über die Zellfunktion mit Hilfe der vitalen Färbung. Zeitschr. f. exp. Pathol. u. Therap. 1911. Bd. 9.
67. Morgenroth, Ueber innere Desinfection. Therap. Monatsh. Bd. 56. S. 95.
68. Moro und Stheemann, Klinische Ueberempfindlichkeit. II. Oertliche Hautreaktion auf Atoxyl. Münchener med. Wochenschr. 1909. Bd. 56.
69. Nicolle et Mesnil, Traitement des Trypanosomiasis par les „couleurs de Benzidine“. I^{ère} Part. Etude chimique. Annal. de l'Inst. Past. 1906. T. XX. No. 6. II^{ème} Part. Expériment. Ibid. 1906. T. XX. No. 7.
70. Nietzky, Chemie der organischen Farbstoffe. IV. Aufl.

71. Nuttall, The discovery of a remedy for malignant jaundice in the dog and for redwater in cattle. Proc. of Royal Society. 1909. Bd. 81. p. 549.
72. L. Paul, Ueber eine natürliche Systematik der Azofarbstoffe. Zeitschr. f. angew. Chemie. 1904. Bd. XVII. S. 1809.
73. Ribbert, Die Abscheidung intravenös injicirten gelösten Carmins in den Geweben. Zeitschr. f. allgem. Physiol. 1904. Bd. 4.
74. H. Ritter, Ueber die Verweildauer des Arsens im thierischen Organismus nach intravenöser Einspritzung von Salvarsan. Deutsche med. Wochenschr. 1912. No. 4.
75. Rost, Ueber Kernfärbung an fixirten Zellen und innerhalb des lebenden Thieres. Archiv f. d. ges. Physiol. 1911. Bd. 137.
76. Ruhland, Jahrb. f. wissensch. Botanik. 1908. Bd. 46.
77. Schaefer, Capitel: Absorption in „Handwörterbuch d. Naturwissenschaften“, herausgegeben v. Teichmann. 1912. Bd. I. S. 41.
78. Scheiber, Ueber die Entwicklung der Lehre von der Valenz. Zeitschr. f. angew. Chemie. 1907. Bd. XX. S. 1761.
79. Schlecht, Experimentelle Untersuchungen über die Resorption und die Ausscheidung des Lithioncarmins unter physiologischen und pathologischen Bedingungen. Ziegler's Beiträge. 1907. Bd. 40.
80. Schmidt, Ausführliches Lehrbuch der pharmazeutischen Chemie. IV. Aufl. Braunschweig 1901.
81. Schulemann, Beiträge zur Vitalfärbung. Archiv f. mikrosk. Anat. 1912. Bd. 79.
82. Derselbe, Vitalfärbung und Chemotherapie. Berliner klin. Wochenschr. 1912. No. 11.
83. Schultz und Julius, Tabellarische Uebersicht der künstl. organ. Farbstoffe. IV. Aufl. Berlin 1902.
84. Stümpke, Salvarsan und Fieber. Deutsche med. Wochenschr. 1912. No. 4.
85. Weil, Die acute freie Peritonitis. Aus: Ergebnisse der Chirurgie und Orthopädie, herausgeg. von Payr und Küttner. Berlin 1911. Bd. II. S. 278.
86. A. Werner, Ueber die raumisomeren Kobaltverbindungen. Liebig's Annalen der Chemie. 1911. Bd. 386. S. 1.
87. Derselbe, Neuere Anschauungen auf dem Gebiete der anorganischen Chemie. Braunschweig 1907.
88. Derselbe, Lehrbuch der Stereochemie. 1904.
89. Derselbe, Zeitschr. f. anorganische Chemie. 1893. Bd. 3. S. 267.
90. Derselbe, Liebig's Annalen. 1902. Bd. 322. S. 261.
91. Derselbe, Berichte d. deutschen chem. Gesellsch. 1907. Bd. 40. S. 468.
92. Zaretsky, Versuche über vitale Färbung des Embryos. Virchow's Archiv. 1910. Bd. 201.

Weitere Literatur siehe bei: Abelin, Aschoff, Fränkel, Goldmann, Haller, Hoeber, Lee und Mayer, Ley, Schaefer, Scheiber, Schulemann, Schultz und Julius, Weil, Werner.