Zeitschrift: Berichte der Schweizerischen Botanischen Gesellschaft = Bulletin de la Société Botanique Suisse

Herausgeber: Schweizerische Botanische Gesellschaft

Band: 54 (1944)

Artikel: Über die Metachromasie der Benzidinfarbstoffe in der pflanzlichen Histologie

Autor: Michel, Werner

DOI: https://doi.org/10.5169/seals-38512

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Mehr erfahren

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. En savoir plus

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. Find out more

Download PDF: 09.12.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, https://www.e-periodica.ch

Über die Metachromasie der Benzidinfarbstoffe in der pflanzlichen Histologie.

Von *Werner Michel.*

(Aus dem pflanzenphysiologischen Institut der Eidg. Technischen Hochschule in Zürich.)

Eingegangen am 1. September 1943.

Inhaltsübersicht.

Seite

Einleitung und Problemstellung 20

A. Die metachromatische Färbung von Pflanzenschnitten 21
1. Untersuchte Farbstoffe 21
2. Die histologischen Objekte, Färbemethode und weitere Behandlung . . 25

B. Ultrafiltration der Farbstoffe 32
1. Ergebnisse der Ultrafiltration 32
2. Die Dispersität der Farbstofflösungen 35

C. Hydrophile und lipophile Eigenschaften der Farbstoffe 40
1. Trennung der Farbstoffe durch Ausschütteln 40
2. Adsorptionsmethode zur Trennung 46

D. Charakterisierung der isolierten Farbstoffkomponenten 50
a) Methode 50
b) Typische Farbkurven von Kongorot und seinen Komponenten . . 51
c) Typische Farbkurven von Benzoazurin standardisiert und seinen Komponenten 55
d) Typische Farbkurven der übrigen untersuchten Farbstoffe 58
e) Quantitative Bestimmung der adsorbierten Farbstoffmengen . . . 58

E. Optische Untersuchung von Dispersitätsreihen 61

F. Dichroismus der substantiven Färbungen 62

G. Besprechung der Ergebnisse 64
1. Der Zusammenhang zwischen färberischen Eigenschaften und Hydrophilie substantiver Farbstoffe 64
2. Die Metachromasietheorie der substantiven Farbstoffe in neuer Beurteilung 66

Zusammenfassung 68

Literaturverzeichnis 69

Einleitung und Problemstellung.

Schnitte durch pflanzliche Gewebe werden von vielen Benzidinfarbstoffen (Benzoazurin, Oxaminblau, Kongorot usw.) *metachromatisch* gefärbt, indem zellulosische und verholzte Zellwände nach Behandlung in einem wässerigen Färbebad verschiedene Farbtöne aufweisen. Nach der Definition der Metachromasie (Michaelis, 1903) müssen die unterschiedlichen Farbeffekte von einem *chemisch einheitlichen Farbstoff* herrühren, dessen Absorptionsspektrum sich je nach dem Aggregationszustande seiner Farbstoffmoleküle ändert. Da die Benzidinfarbstoffe als Kolloidteilchen in Lösung gehen, ist von verschiedenen Autoren (Haller 1921, Freundlich 1922, Schwarz 1924, Czaja 1930, Ziegenspeck 1941) angenommen worden, ihr Farbton sei von der Teilchengröße abhängig. Ein Zusammenhang zwischen Lichtabsorption einer kolloiden Lösung und der Größe der suspendierten Teilchen ist von Wo. Ostwald (1911, 1912) für kolloide Goldlösungen gegeben worden. Nach dieser Farbendispersitätsregel absorbieren größere Teilchen langwelligeres Licht als kleinere Teilchen.

Entsprechend dieser Auffassung würden die metachromatischen Farbstofflösungen *heterodisperse* Kolloidsysteme vorstellen. Bei der Färbung der Zellwände würden die kleinen Farbstoffteilchen in die feineren submikroskopischen Räume der verholzten Membranen eindringen, während die größeren nur in die etwas lockerer gebauten zellulosischen Wände einzuwandern vermöchten. Wenn diese Theorie den tatsächlichen Verhältnissen entspricht, so müßte man mit Hilfe der metachromatischen Effekte der Benzidinfarbstoffe quantitative Angaben über die Dimensionen der submikroskopischen Räume in zellulosischen und inkrustierten Zellwänden machen können. Eine derartige Auswertung wäre sehr wertvoll.

Es bestehen jedoch berechtigte Zweifel, ob die Metachromasie der Benzidinfarbstoffe in so einfacher Weise als ein Effekt der Heterodispersität gedeutet werden darf; denn die Farbendispersitätsregel von Wo. Ostwald bezieht sich ausschließlich auf Goldlösungen und hat bisher stets versagt, wenn man sie auf kolloide Farbstofflösungen übertragen wollte (Valkó 1937, Schramek 1940). Auch die Methode der Ultrafiltration, die von Czaja zur Analyse der Heterodispersität angewendet worden ist, ergibt keine Resultate, die mit Sicherheit auf die Größe der durchgelassenen Teilchen schließen lassen. Die Porenweite des Filters kann nämlich aus chemischen oder elektrostatischen Gründen den Durchmesser der Teilchen im Filtrat oft bis eine Größenordnung übertreffen (Morton 1935).

Aus diesen Gründen schien es erwünscht, die Frage der Metachromasie von Benzidinfarbstoffen bei der Färbung pflanzlicher Objekte

einer erneuten Prüfung zu unterziehen. Dabei stellte sich heraus, daß ganz andere Eigenschaften der Farbstofflösungen als ihre Teilchengröße für diese auffallenden und interessanten Farbeffekte verantwortlich sind.

A. Die metachromatische Färbung von Pflanzenschnitten.

1. Untersuchte Farbstoffe.

Von den vielen bekannten Benzidinfarbstoffen wurden für die Untersuchungen die in der Literatur meistangeführten Typen ausgewählt. Sie sind in Tabelle 1 zusammengestellt.

a) Reinheit der verwendeten Farbstoffe.

Die Farbstoffe, für die in Tabelle 1 keine Bezugsquelle angegeben ist, wurden von der Teerfarben AG. in Zürich bezogen. Vom Farbstoff Kongorot standen drei Muster zur Verfügung, je eines von Grübler und von Kahlbaum, die sich als identisch erwiesen, und ein drittes reinstes, salzfreies Produkt, welches unserm Institut von Herrn Prof. Ruggli gütigst zur Verfügung gestellt wurde (Ruggli und Jensen 1935). Außer dem letztgenannten Kongorot waren alle Farbstoffe mehr oder weniger mit anorganischen Salzen versetzt. So konnte z. B. im Benzoazurin (Originalpulver) ca. 60 % anorganischer Beimischungen (wahrscheinlich NaCl) festgestellt werden, indem eine konzentrierte Lösung von « Benzoazurin standardisiert » in 80 % n-Propylalkohol umkristallisiert wurde. Die Kristalle konnten nachher mechanisch getrennt und die Komponenten ausgewogen werden.

Eine Reinigungsmethode für handelsübliche Farbstoffe wird von Robinson (1935) angegeben. Da aber für unsere Versuche der Salzgehalt keine Rolle spielte, verwendeten wir die Farbstoffe, wie sie von der Bezugsquelle geliefert wurden.

b) Chemismus der verwendeten Farbstoffe.

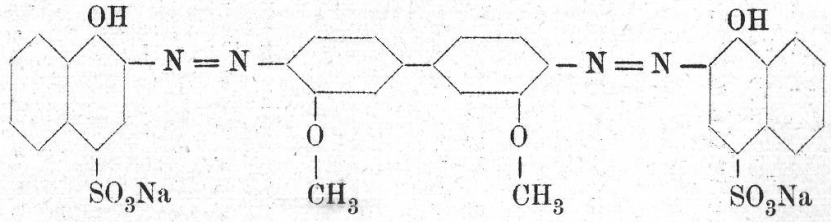
Die Benzidinfarbstoffe sind Verbindungen der Diazokörper des Benzidins, o-Tolidins oder o-Dianisidins mit gewissen Sulfonaphtholsäuren. Die Konstitution der verwendeten Farbstoffe ist in Tabelle 1 angegeben. Die HSO_3-, NH_2- und OH-Gruppen, die für das Farbstoffmolekül charakteristisch sind, bedingen die elektrischen Eigenschaften der Verbindung.

Gewisse Benzidinfarbstoffe besitzen die interessante Eigenschaft der *Substantivität :* legt man zellulosisches Material in die Lösung eines solchen Farbstoffes, so wird eine gewisse Menge der Farbstoffmoleküle aufgenommen (Adsorption). Beim nachfolgenden Auswaschen läßt sich ein Teil des Farbstoffes wieder entfernen (Desorption). Als Substanti-

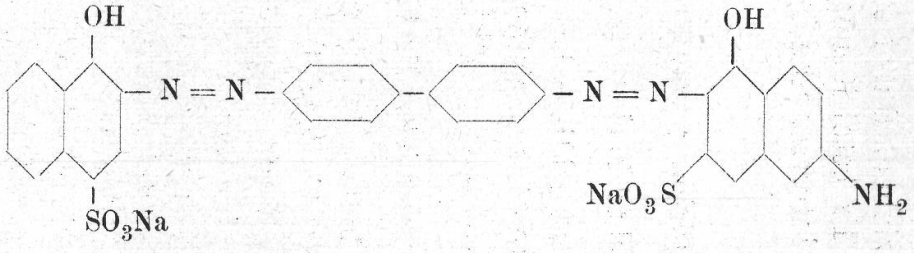
Tabelle 1.

Verwendete Farbstoffe, Formeln, Bezugsquelle und Literatur (in Klammer).

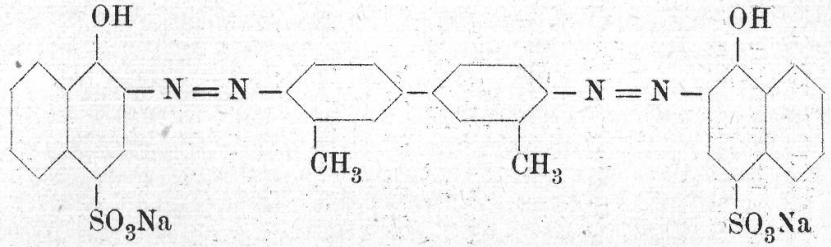
Benzoazurin standardisiert, Holborn (Rowe 1924).



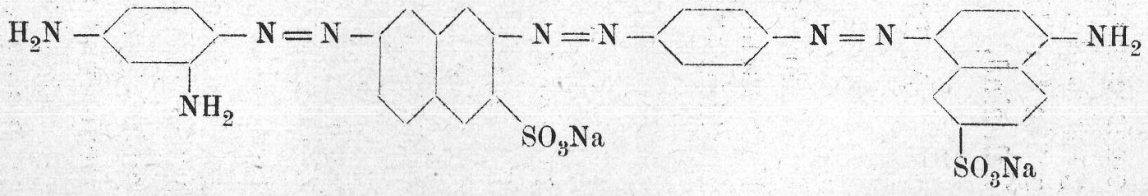
Benzoazurin 3 R, identisch mit Oxaminblau 4 R, Holborn (Rowe 1924).



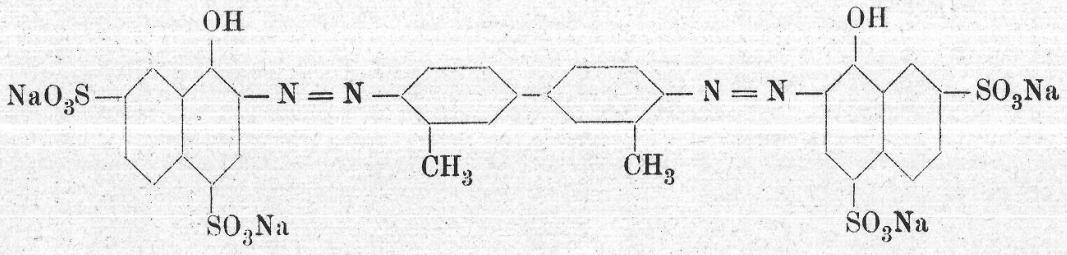
Azoblau, Holborn (Schultz 1923).



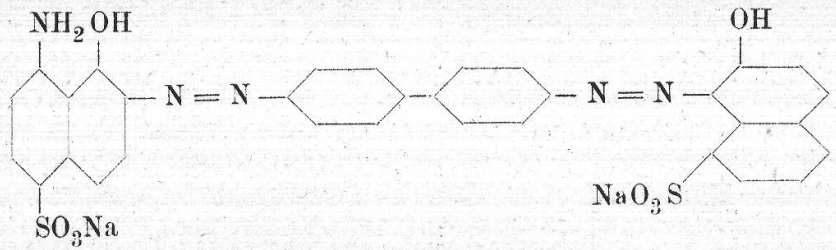
Columbiaschwarz FF extra (Schultz 1923).



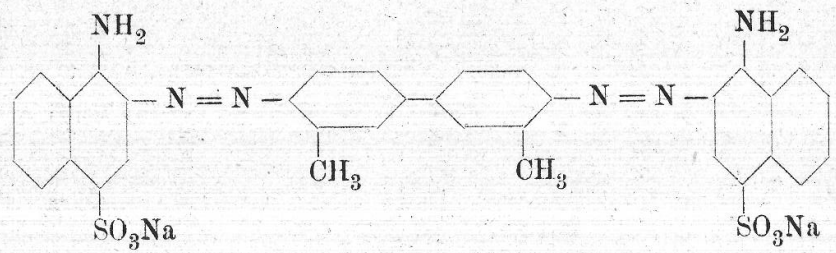
Dianildunkelblau R (Rowe 1924).



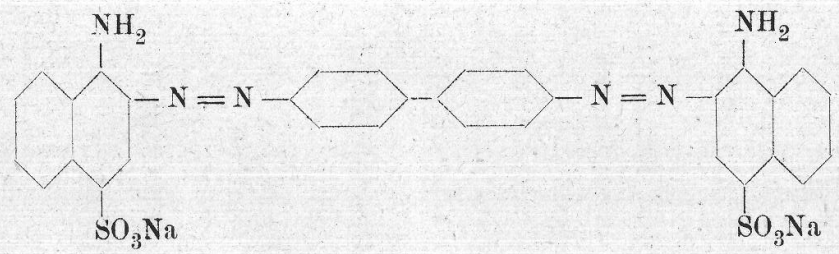
Chicagoblau R (Rowe 1924; Schultz 1923).



Benzopurpurin 4B, Ciba (Schultz 1923).



Kongorot, Kahlbaum, Grübler, Ruggli (Schultz 1923).



vität bezeichnet man nach Krüger (1939) die Differenz zwischen adsorbierter und desorbierbarer Farbstoffmenge.

In ihrer Konstitution ganz ähnliche Benzidinfarbstoffe verhalten sich in bezug auf die Substantivität zum Teil verschieden. Kongorot und Benzopurpurin 4 B besitzen beide ungefähr die gleiche Substantivität; sie unterscheiden sich dadurch, daß beim letztern Farbstoff am Benzidinkern zwei Methylgruppen in o-Stellung substituiert sind. Diese Konstitutionsänderung scheint also auf die Substantivität keinen großen Einfluß zu haben. Nur geringe Substantivität zeigt dagegen der isomere Farbstoff des Benzopurpurins 4 B, der durch Substitution der Methylgruppen in m-Stellung entsteht (von Robinson [1935] als Meta-Benzopurpurin 4 B bezeichnet). Auch Schirm (1935) macht darauf aufmerksam, daß nicht alle Benzidinfarbstoffe substantiv sind, selbst wenn sie in ihrem System konjugierter Doppelbindungen übereinstimmen.

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Farbstoffe zeigen alle große Substantivität, soweit dies qualitativ festgestellt werden konnte.

c) Einheitlichkeit der Farbstoffe.

Die verwendeten Verbindungen ergeben beim Behandeln pflanzlicher Schnitte unterschiedliche Färbung der zellulosischen und der verholzten Zellwände. « Benzoazurin standardisiert » färbt z. B. die zellulosischen Wände blau, die verholzten Zellwände rot. Damit diese auffallende Erscheinung als Metachromasie bezeichnet werden kann, muß nach der Definition von Michaelis (1903) der Farbstoff einheitlich sein. Um dies zu prüfen, wurde die wässerige Farbstofflösung mit Amylalkohol ausgeschüttelt.

In einem Reagenzglas wird die Farbstofflösung mit Amylalkohol überschichtet, nicht zu stark umgeschüttelt und die Trennung der Lösungsmittel abgewartet. Beim Schütteln darf keine Emulsion entstehen, da sich die beiden Lösungsmittel sonst schwer trennen.

Man beobachtet nun beim Ausschütteln von « Benzoazurin standardisiert », daß die wässerige Lösung blau wird, während die überstehende Amylalkohollösung eine rote Färbung annimmt. Selbst das Kongorot von Ruggli zeigte diese Farbentrennung, hier wird die wässerige Lösung karminrot, die Amylalkohollösung mehr ziegelrot.

Mit Hilfe dieser Modellversuche ließen sich alle untersuchten Farbstoffe in zwei verschiedenfarbige Lösungen trennen (s. S. 41 ff.).

Diese orientierenden Versuche ließen den Verdacht aufkommen, daß die untersuchten substantiven Farbstoffe wahrscheinlich Gemische darstellen (meist binäre), deren Komponenten sehr verschiedene Eigenschaften besitzen.

Amylalkohol ist als relativ lipophiles Lösungsmittel bekannt. Im folgenden wird nun die Farbstoffkomponente, die durch Amylalkohol gelöst wird, als lipophil (« fettliebend »), diejenige, die im Wasser gelöst ist, als hydrophil (« wasserliebend ») bezeichnet.

2. Die histologischen Objekte, Färbemethode und weitere Behandlung.

a) Methode.

Die zur Färbung verwendeten pflanzlichen Objekte wurden meist mit Alkohol (70 %) fixiert und nach dem Schneiden mit dem Handmikrotom in Eau de Javelle aufgehellt. Ich konnte übereinstimmend mit Schwarz (1924) feststellen, daß weder die Fixierung noch die Behandlung mit Eau de Javelle einen Einfluß auf die Resultate der Färbung hat. Ebenso hat das Auswaschen der Schnitte mit einer 5 % Natrium-Thiosulfatlösung zur Entfernung des in den Schnitten zurückgebliebenen Eau de Javelle keinen Einfluß auf die nachfolgende Färbung. Auch konnten die Objekte, nachdem sie mindestens ein Jahr in Alkohol 70 % aufbewahrt worden waren, immer noch in der gewohnten Weise gefärbt werden.

Die Farbstoffe wurden meist in Lösungen von 1 ‰ in destilliertem Wasser angewendet. Versuche mit andern Lösungsmitteln wurden nur in speziellen Fällen durchgeführt, doch soll darüber in spätern Abschnitten berichtet werden. Glaubersalz- oder andere Salzzusätze unterblieben, da sich dadurch die Färberesultate nicht änderten. Bei der Lösung des Kongorotes mußte eine kleine Menge Ammoniak zugefügt werden, um das Ausfallen und Umschlagen der Farbe durch Spuren von Säure zu verhindern.

Zur Färbung der Objekte genügte mit den oben angegebenen Konzentrationen in den meisten Fällen eine Färbedauer von drei Tagen (Schwarz 1924). Sie kann aber ohne Schädigung der Objekte verlängert werden. Zur Färbung mit Kongorot genügen wenige Minuten bis einige Stunden.

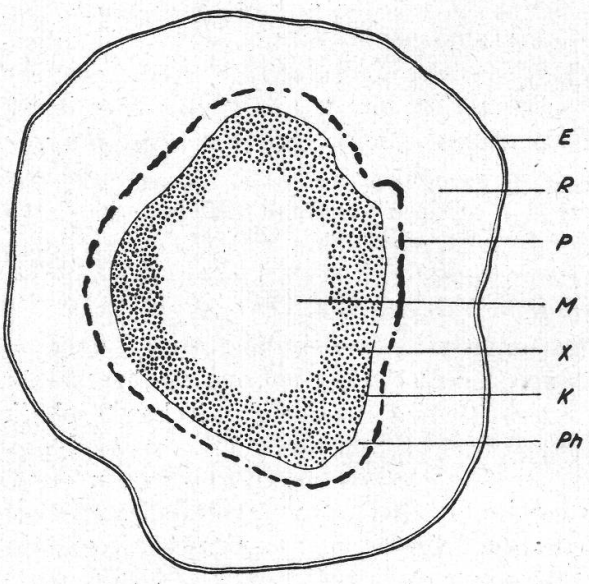
Um die Ergebnisse der einzelnen Färbungen an den pflanzlichen Schnitten jederzeit miteinander vergleichen zu können, mußten Dauerpräparate hergestellt werden. Als Einschlußmittel kam leider der sonst in der mikroskopischen Technik übliche Kanadabalsam nicht in Frage, da beim Überführen durch die verschiedenen Alkoholstufen die Farbe aus den verholzten Zellwänden herausgewaschen wird. Für die vorliegende Arbeit war es aber notwendig, daß die Farbtöne sämtlicher Zellwände auch in den Dauerpräparaten erhalten blieben. Schwarz (1924) schlägt das Hoyersche Einschlußmittel als das für die metachromatische Färbung geeignetste Medium vor. Dieses besteht aus einer Lösung von Gummi arabicum in 33 % K-Acetat und soll in sirupdicker Lösung verwendet werden (Schneider 1922). Die Schnitte werden aus dem Waschwasser direkt oder über eine Mischung von Wasser mit Gummi arabicum in das Einschlußmittel gebracht. Blasenbildung ist auch bei äußerst vorsichtiger Anwendung kaum zu vermeiden; auch ziehen die Präparate beim Eintrocknen gerne schlauchartige Luftblasen unter das Deckglas. Ein Lackring erübrigt sich. Der Brechungsindex beträgt ungefähr 1,42.

Ein besseres Einschlußmittel konnte bis jetzt nicht gefunden werden, so daß die erwähnten Mängel in Kauf genommen werden mußten.

b) Objekte.

Die metachromatische Färbung soll nach der Definition von Michaelis (1903) verschiedene Gewebselemente in verschiedener Nuance anfärben. Für die eigentliche Untersuchung kamen deshalb nur Objekte in Frage, deren Membranen recht verschiedenen Chemismus haben und deren Wandverstärkungen ebenfalls verschiedenartig sind.

Die größten Unterschiede im Chemismus weisen zellulosische und verholzte Zellwände auf. Membranen mit gleichem Chemismus, aber verschiedener Dichte, waren sowohl bei den zellulosischen wie bei den verholzten Zellwänden erwünscht, da ja der Metachromasieeffekt von Czaja (1930) auf verschiedene Dichte der Zellwände (Poreneffekt) zurückgeführt wurde. Als zellulosische Wände von verschiedener Dichte kann man die parenchymatischen und anderseits die kollenchymatischen Zellwände einander gegenüberstellen. Verholzte Zellwände verschiedener Dichte findet man in den Xylemzellen und verschiedenen Bastfasern einerseits und den Sklerëiden anderseits.



Figur 1.
Ilex Aquifolium L. Querschnitt durch einen zweijährigen Stengel (schematisch). E Epidermis, R primäre Rinde, P Perizyklus, Ph Phloem, K Kambium, X Xylem, M Mark. (Vergr. ca. 20×).

Die Querschnitte durch zwei- bis dreijährige Stämmchen von *Ilex Aquifolium L.* (Fig. 1), die in der Literatur häufig erwähnt werden (Czaja 1930), eignen sich für diese Färbung ausgezeichnet. Die Kutikula ist gut entwickelt. Die primäre Rinde (R) und das Phloem (Ph) bestehen aus Zellulose, der Perizyklus (P) aus ziemlich stark verholzten Bastfasern, deren Lücken in älteren Zweigen durch stark verholzte Steinzellen (Sklerëiden) ausgefüllt sind (Fig. 2). Die Zellen des Xylems sind etwas weniger verholzt.

Zur genauern Untersuchung des Xylems wurden auch Längsschnitte von *Ilex Aquifolium* mit den entsprechenden Farbstoffen gefärbt.

Um Färbungen der kollenchymatischen Wandverstärkungen zu erhalten, wurden Stengelquerschnitte von Salvia pratensis untersucht.

Eine weitere Bereicherung ergab die Färbung von Längsschnitten durch den Stengel von *Vitis vinifera,* die im Herbst nach der Bildung von Kallusplatten fixiert worden waren. Diese wurden zu Versuchen mit verschiedenen Benzidinfarbstoffen verwendet.

c) Ergebnisse der Färbungen.

I. Verhalten der Kutikula und der Epidermis.

Die sehr dicke Kutikula von *Ilex Aquifolium* ist oft schon in ungefärbten Schnitten, auch wenn sie mit Eau de Javelle behandelt worden sind, gelb gefärbt. In der Beurteilung der Ergebnisse ist deshalb Vorsicht am Platze, insbesonders bei der Behandlung mit Farbstoffen, deren eine Komponente gelb ist.

Die Färbung mit « Benzoazurin standardisiert » verursacht eine intensive Rotfärbung der Kutikula. Die Färbung ist aber nicht einheitlich, indem die äußere Schicht meist nur schwach rötlich, etwas gelbstichig gefärbt ist, während die der Zellulosemembran aufliegende Schicht meist stark gefärbt ist. Der Farbton macht, offenbar durch den gelben Ton der Kutikula aufgehellt, einen etwas lebhafteren Eindruck als gewöhnlich. Die gegen die Zellen der primären Rinde gelegene, rein zellulosische Wand der Epidermiszellen ist blau gefärbt.

« Benzoazurin standardisiert », Brillantkongoblau und Azoblau stimmen in der Anfärbung der Kutikula miteinander überein. Um eine Rötung der Kutikula mit Dianildunkelblau R ebenfalls zu erhalten, mußten die Schnitte etwas länger gefärbt werden.

Der Farbton der Kutikula der mit Columbiaschwarz FF extra, Dianilschwarz N und Oxaminblau 4 R gefärbten Schnitte stimmt mit der Farbe der lipophilen Komponente dieser Verbindungen überein. Die Abstufung der Färbung in den einzelnen Kutikularschichten ist analog den oben beschriebenen Beobachtungen.

Die Beurteilung der mit Kongorot und Benzopurpurin 4 B gefärbten Schnitte stößt infolge der gelblichen Tönung der lipophilen Komponente dieser Farbstoffe auf Schwierigkeiten. Die stets intensive Gelbfärbung der Kutikula mit diesen Farbstoffen läßt vermuten, daß eine Farbaufnahme auch hier stattfindet.

Die Kutikula des Stengels von *Salvia pratensis,* die bedeutend schwächer entwickelt ist als diejenige von *Ilex Aquifolium,* verhält sich bei der Anfärbung mit den erwähnten Benzidinfarbstoffen im großen ganzen gleich. Die Anfärbung erfolgt immer nur mit der lipophilen Komponente des Farbstoffes, wobei die größte Intensität in der Nähe der Zelluloseschicht der Epidermiszellen beobachtet wird. Die letztern

sind in der Farbe der hydrophilen Komponente des Farbstoffes gefärbt.

II. Das Verhalten der Zellulosemembranen und des Kollenchyms.

Die *parenchymatischen* Zellwände der primären Rinde von *Ilex Aquifolium* werden mit « Benzoazurin standardisiert » blau mit einem leicht rötlichen Ton gefärbt. Das *Kambium* (K) ist nur schwach, das *Phloem* bedeutend intensiver gefärbt. Diese verschieden starke Farbstoffaufnahme durch die einzelnen Typen von Zellulosemembranen konnte auch mit andern Benzidinfarbstoffen und an andern Objekten festgestellt werden. Untersucht wurden unter anderm noch Querschnitte durch die Stengel von *Salvia pratensis, Zea Mays, Cucurbita Pepo, Aristolochia Sipho,* Blattquerschnitte von *Abies alba, Iris germanica* usw.

Die Zellen des *Markes* (M) werden mit « Benzoazurin standardisiert » blau gefärbt; wenn sie aber verholzt sind, zeigen sie eher die Farbe der lipophilen Farbstoffkomponente.

Nimmt man als Ausgangslösungen die roten Farbstoffe Kongorot und Benzopurpurin 4 B, so erhalten Zellulosewände einen karminartigen Ton, die verholzten Zellen des Marks werden zinnober gefärbt. Im übrigen stimmen die Ergebnisse mit denen der übrigen Farbstoffe überein.

Auf Stengelquerschnitten von *Salvia pratensis* läßt sich ein Intensitätsunterschied zwischen der Färbung der Zellwände des tiefergelegenen Rindenparenchyms und des Assimilationsgewebes feststellen. Die letztern zeigen eine bedeutend stärkere Farbstoffaufnahme.

Das *Kollenchym* in Stengelquerschnitten von *Salvia pratensis* wird ebenfalls wie die übrigen zellulosischen Zellwände blau gefärbt. Die Färbung ist jedoch nicht so intensiv, sicher nicht intensiver als die der parenchymatischen Zellen. Das gleiche Ergebnis konnte beim Kollenchym in Stengelquerschnitten von *Heracleum Mantegazzeanum* festgestellt werden. Nach dem Einbringen der Präparate in das Hoyersche Einschlußmittel ist eine Abnahme der Intensität der Färbung des Kollenchyms zu verzeichnen. Sie kann auf die starke Quellung der Eckverstärkungen bei dieser Präparation zurückgeführt werden. Der große Pektingehalt der kollenchymatischen Zellwände (Anderson 1927) scheint ohne Einfluß auf die Färbung zu sein.

III. Verhalten der verholzten Membranen und Steinzellen.

Die meisten Zellen des Xylems färben sich mit « Benzoazurin standardisiert » in einem Rotlilaton an, der mit der Farbe der lipophilen Komponente, die beim Ausschüttelungsversuch erhalten wird, übereinstimmt. Die Farbe ist aber nicht so leuchtend wie in der Kutikula. Auch sind nicht alle Zellen des Xylems gleichmäßig gefärbt. Dies ist leicht

verständlich, da in der Regel nicht alle Zellen gleich stark verholzt sind. In Querschnitten von *Ilex Aquifolium* lassen sich sogar ganz deutlich Xylemzellen erkennen, die mit Benzoazurin blau gefärbt werden. Wieder andere zeigen eine Mischfarbe, die oft über die Dicke der Zellwand von mehr blau bis mehr rot variiert. Die letzterwähnte Erscheinung kommt vor allem bei *Längsschnitten* von *Ilex* zur Geltung.

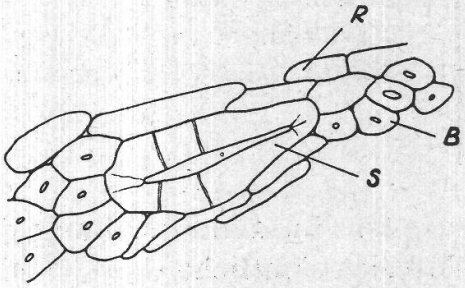
Mit Kongorot nehmen die Xylemzellen einen zinnoberroten Ton an. Im übrigen ergaben alle untersuchten Farbstoffe übereinstimmende Resultate.

Die obenerwähnte Mischfarbe läßt sich auf zwei verschiedene Arten analysieren. Entweder wird mit Hilfe von 70 % Alkohol die rote Komponente aus dem Schnitt ausgewaschen; dabei bleibt nur wenig blau in einzelnen Zellen des Xylems übrig. Oder es wird eine weitere interessante Eigenschaft der Benzidinfarbstoffe, der *Faserdichroismus* zu Hilfe gezogen. Hierüber wird in einem spätern Abschnitt berichtet werden. (S. 62.)

Die Bastfasern des Perizyklus von *Ilex Aquifolium* sind ebenfalls verholzt. Auf Querschnitten durch etwas ältere Stengel finden sich zwischen den Bastfaserbündeln häufig Lücken, die mit Steinzellen ausgefüllt sind (Fig. 2). Diese sind noch stärker verholzt als die Bastfasern.

Mit Benzoazurin oder Brillantkongoblau werden die Bastfasern durchgehend rotlila gefärbt. Die Färbung ist intensiver und reiner als diejenige der verholzten Xylemzellen. Auch die Steinzellen sind rötlich gefärbt, doch ist die Intensität der Färbung bedeutend geringer.

Nach der Färbung mit Kongorot und Benzopurpurin 4 B erscheinen die Bastfasern intensiv zinnober und die Steinzellen in einem reinen Gelb.

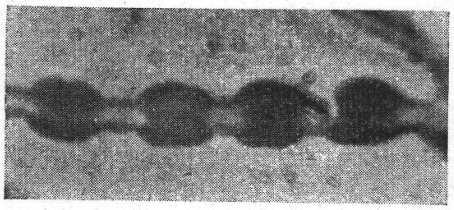


Figur 2.
Ausschnitt aus dem Perizyklus von *Ilex Aquifolium* mit Bastfasern (B), Steinzelle (S) und Rindenparenchym (R). Vergr. ca. 120.

IV. Verhalten der Kallusplatten.

Im Herbst werden die Siebröhren des Phloems von *Vitis vinifera* durch Kallusplatten verstopft. Diese pfropfenartigen Gebilde können ebenfalls mit verschiedenen Benzidinfarbstoffen gefärbt werden. Schneider (1922) erwähnt die Färbung mit Benzoazurin, Azoblau usw. Zur Untersuchung eignen sich am besten tangentiale Längsschnitte durch das Phloem des Stengels. Die Kallusplatten nehmen die lipophile Komponente aus den Farbstofflösungen auf, die Farbstoffan-

reicherung ist größer als in den verholzten Zellwänden. Mit Benzoazurin, Azoblau und Brillantkongoblau wurde ungefähr dasselbe Resultat erreicht.



Figur 3.
Längsschnitt durch eine Siebplatte einer Siebröhre von *Vitis vinifera,* die durch Kalluspfropfen verstopft ist.

V. Zusammenstellung der färberischen Ergebnisse.

Tabelle 2.

Farbstoff	Zellulose Parenchym	Kollenchym	Epidermis	Kutikula
Benzoazurin . . .	azurblau	schwach azurblau	azurblau	rotgelblich
Brillantkongoblau .	blau	schwach blau	blau	rot
Chicagoblau . . .	blau		schmutzig dunkelblau	gelbviolett
Dianilschwarz . .	schmutzig dunkelblau		schmutzig dunkelblau	
Kongorot	karmin	schwach karmin	karmin	gelb
Benzopurpurin . .	karmin		karmin	gelb
Benzoazurin und Chrysoidin in Kanadabalsam .	azurblau	schwach azurblau	azurblau	gelb

Die Zusammenstellung der Ergebnisse (Tabelle 2) zeigt eindeutig, daß sich sämtliche Gewebe mit zellulosischen Zellwänden mit allen Farbstofflösungen gleich verhalten: sie färben sich immer mit demjenigen Farbton an, der beim Ausschüttelungsversuch in der wässrigen Lösung beobachtet wird. Besitzen die Membranen Lignineinlagerungen oder sonstwie lipophilen Charakter (Kallusplatten), so nehmen sie dagegen übereinstimmend den Farbton an, der im Modellversuch im Amylalkohol gefunden wird. Man ist daher berechtigt, als Arbeitshypothese aufzustellen, daß in erster Linie die hydrophilen resp. lipophilen Eigenschaften der Membranen die « Metachromasie » der untersuchten Farbstoffe bestimmen.

Um den Grad der Hydrophylie von den Membranen in unsern Objekten eindeutig festzulegen und damit die Ergebnisse zu sichern, wurden noch Kontrollversuche unternommen mit Farbstoffen, von denen die bisherigen Erfahrungen der histologischen Färbetechnik eindeutig ergeben haben, daß sie hydrophile, resp. lipophile Zellwände ausgesprochen selektiv anzufärben vermögen.

VI. Bestätigung mit Farbstoffen von bekanntem Verhalten.

Als Beispiel eines Farbstoffes, der die *Zellulose* leicht anzufärben vermag, sei Hämatoxylin genannt. Er hat hydrophilen Charakter. Im Gegensatz dazu zieht Chrysoidin nur auf Membranen mit lipophilen Eigenschaften auf. Die Doppelfärbung mit Hämatoxylin-Chrysoidin ergibt nun die gleiche Farbstoffverteilung wie bei einer Färbung mit Benzoazurin : die lipophile Komponente dieses Farbstoffes findet sich ausschließlich in den Zellwänden, die sich mit Chrysoidin gefärbt haben. Desgleichen färbt sein hydrophiler Bestandteil nur jene Gewebe, auf die auch Hämatoxylin aufzieht.

Eine Anwendung der Doppelfarbigkeit des Kongorots liegt übrigens im bekannten *Genferreagens* (Chodat, 1891) vor, einem Gemisch von Chrysoidin und Kongorot. Durch das Chrysoidin wird die lipophile Komponente des Kongorots ersetzt, so daß die Färbung des Xylems rein gelb wird.

Ferner ist es gelungen, eine Doppelfärbung mit Benzoazurin und Chrysoidin zu erhalten, die sich auch zum Einschluß in Kanadabalsam eignet. Die Zellulosewände werden dabei sehr zart blau gefärbt.

Mit alkoholischer Chrysoidinlösung wird ziemlich stark gefärbt und in Wasser ausgewaschen; mit Benzoazurin 0,5 % wäßrig einige Minuten bis mehrere Stunden gefärbt und in Wasser gewaschen. Die Schnitte dürfen beim Überführen in Kanadabalsam nicht zu lange in den Alkoholstufen verharren, da das Chrysoidin leicht ausgewaschen wird.

Die Färbung wurde an vielen Objekten geprüft (*Tilia,* Stengel; *Zea Mays,* Stengel; *Asparagus,* Stengel; *Eupteris,* Stengel; *Ranunculus,* Stengel; *Iris,* Blatt; Nadeln von *Coniferen* usw.). Die bei *Salvia* gefundenen Resultate in bezug auf Intensität der Färbung der Zellulose und die Anfärbung der verholzten Gewebe durch Chrysoidin an Stelle der lipophilen Komponente der Benzidinfarbstoffe wurden durch diese Färbungen bestätigt.

d) Vergleich mit den Ergebnissen anderer Autoren.

Schwarz (1924) und Czaja (1930) stellten mit substantiven Farbstoffen ähnliche Resultate fest, wie sie in Tabelle 2 zusammengestellt sind. Schwarz sucht die verschiedenen Färbungen mit ein und demselben Farbstoff damit zu erklären, daß er annimmt, es seien verschieden große Teilchen in der Lösung vorhanden, so daß die Farben-

dispersitätsregel Ostwalds darauf angewandt werden könne. Czaja kommt darauf fußend zum Schluß, daß die Zellwände «Sätze von Ultrafiltern darstellen». Mit Hilfe der Ultrafiltrationsmethode ist es ihm auch gelungen, die untersuchten Farbstoffe in Komponenten zu zerlegen, die den Färbungen der verholzten und der zellulosischen Zellwände entsprechen. Wenn diese Ansicht von Czaja richtig wäre, sollte es möglich sein, durch Ultrafilter verschiedener Porengröße (aber mit gleichem Chemismus) die Porengröße der Zellwände (Größe der submikroskopischen intermicellaren Räume) zu bestimmen. Es erscheint allerdings eigenartig, daß sowohl lipophile wie auch hydrophile Zellwände der verschiedensten Pflanzen mit dem gleichen Farbstoff stets die gleiche Färbung aufweisen, während doch wohl anzunehmen ist, daß die Porengröße nicht bei allen Pflanzen dieselbe ist. Ebenso werden die Zellwände mit gleichem Chemismus aber verschiedener Dichte (*Ilex:* Bastfasern-Steinzellen; *Salvia:* Parenchym-Kollenchym) stets mit dem gleichen Farbton tingiert.

Auf Grund dieser Feststellung schien es angebracht, einige Farbstoffe der Analyse durch Ultrafiltration zu unterwerfen, unter Verwendung von Filtern, deren Porengröße einigermaßen bekannt ist.

B. Ultrafiltration der Farbstoffe.

1. Ergebnisse der Ultrafiltration.

a) Methode.

Die Ultrafiltration der Farbstoffe wurde mit einer Ultrafilternutsche und dazu geeigneten Ultrafiltermembranen vorgenommen. Letztere wurden selbst hergestellt (nach Bechhold in Liesegang, kolloidchemische Technologie 1927). Dazu wurden Lösungen von Kollodiumwolle in Eisessig bereitet, in welche runde Papierfilter passender Größe getaucht wurden. Nach vollständiger Benetzung erfolgte die Regeneration der Kollodiummasse in destilliertem Wasser. Nach gutem Auswaschen konnten die Filter in destilliertem Wasser mit Thymolzusatz längere Zeit ohne Schädigung aufbewahrt werden.

Für die Versuche stellten wir Filter aus 2,5-, 4-, 6- und 8 %igen Lösungen her. Über die Porengröße der Filter gibt Tabelle 3 Auskunft. Die Werte dieser Tabelle sind Liesegangs kolloidchemischer Technologie (1927) entnommen.

Tabelle 3.

Daten der Ultrafilter.

Filter: Kollodium-konzentration in %	Es werden zurückgehalten	Größe dieser Teilchen (Durchmesser):
2,5 %	kolloides Eisenchlorid	400 Å
4 %	Gold Nr. 0	40 Å
8 %	Kieselsäuregel	20—35 Å

Zur Kontrolle der Filter wurde in üblicher Weise die Durchlaufszeit von 100 cm³ destilliertem Wasser bei 15 mm Hg bestimmt. Die gemessenen Zeiten sind in Tabelle 4 zusammengestellt. Die Durchlaufszeiten schwanken recht beträchtlich, so daß anzunehmen ist, daß auch die Porengröße stark variiert. Wird aber berücksichtigt, daß der Porendurchmesser der aus der 2,5 %igen und aus der 4 %igen Kollodiumlösung hergestellten Filter nach Tabelle 3 sich um das Zehnfache unterscheiden, so darf wohl angenommen werden, daß die Porendurchmesser der einzelnen Gruppen, trotz der großen Variation der Durchlaufszeit, nicht ineinander übergreifen.

Tabelle 4.

Durchlaufszeiten der Filter.

Filter: Kollodium-konzentration in %	Durchlaufszeit in Minuten
2,5	5—6
4	10—15
6	60—80
8	130—160

Über die Zuverlässigkeit der Ultrafiltrationsmethode kann hier kein Urteil abgegeben werden. Immerhin sei festgestellt, daß in der neuen Auflage von Liesegangs kolloidchemischer Technologie (1932) die Angaben über die Ultrafiltration nicht mehr wiedergegeben sind. In einer Arbeit von Morton (1935) wird auf die großen Unterschiede der Porendurchmesser der Filter und der von ihnen zurückgehaltenen Farbstoffteilchen hingewiesen. Die von Morton verwendeten Äther-Alkohol-Kollodium-Filter sollen Porendurchmesser von 150—200 Å haben, während die von diesen Filtern zurückgehaltenen Farbstoffteilchen einen Durchmesser von nur 10—20 Å aufweisen.

b) Filtration von Benzidinfarbstoffen.

Die Ultrafiltration der verwendeten Farbstoffe ergibt ein recht unterschiedliches Bild. Die Resultate sind in Tabelle 5 zusammengestellt. Ganz der Erwartung entsprachen Oxaminblau, Brillantkongoblau und Benzoazurin 3 R, deren Filtrat nach dem Passieren eines 2,5-%-Filters fast von der ursprünglichen Farbe war. Es scheint, daß nur die Konzentration etwas abgenommen hat. Der fehlende Farbstoff ist zum Teil im Filter zurückgeblieben, zum Teil auf dem Filter abgesetzt. Von einem 4-%-Filter wird schon ziemlich viel des blauen Anteils zurückgehalten, während das Filtrat, das ein 6-%-Filter liefert, einen fast rein roten Ton aufweist. Konzentrationsbestimmungen mit dem Pulfrich-Stufenphotometer ergaben, daß die Filtrate der 6-%-Filter mindestens zwanzigmal weniger konzentriert als die Originallösungen waren. Von Chicagoblau kann mit einem 6-%-Filter eine Komponente erhalten werden, die einen relativ reinen Eindruck macht. Dianilschwarz N läßt eine deutliche Abtrennung einer Komponente schon bei 2,5-%-Filtern zu. Mit 4-%-Fil-

Tabelle 5.
Ergebnisse der Ultrafiltration.

Farbstoff	Filter: Kollodiumkonzentration in %			
	2,5	4	6	8
Oxaminblau 4 R	+	±	—	
Brillantkongoblau 4 RW	+	±	—	
Benzoazurin 3 R	+		—	
Chicagoblau 4 R			—	
Dianilschwarz N	±	—		—
Dianildunkelblau R	±	—	—	—
Columbiaschwarz FF extra	±	—	—	—
Kongorot	±	±	±	±

+ = Farbe der ursprünglichen Lösung.
— = Farbe, wie sie in den pflanzlichen Schnitten die verholzten Zellwände zeigen.
± = Mischfarbe.

tern ist die Trennung nach visueller Beurteilung sehr gut, mit 8-%-Filtern ebenfalls. Die Konzentration des Filtrates nach Passieren des 2,5-%-Filters beträgt ungefähr $^1/_{20}$ der ursprünglichen Lösung, nach Durchtritt durch ein 8-%-Filter ungefähr $^1/_{100}$ der ursprünglichen Lösung. Beim Dianildunkelblau und beim Columbiaschwarz liegen die Verhältnisse ähnlich, nur daß beim erstern das 2,5-%-Filter noch geringe Durchlässigkeit für den Blauanteil zeigt, bei letzterem auch das 4-%-Filter. Beim Kongorot konnte mit dem feinsten Filter kaum eine Veränderung festgestellt werden. Der Farbton war immer karminartig, die Konzentration wurde durch ein 8-%-Filter relativ wenig verändert.

Die Filter zeigten nach der Ultrafiltration die Farbe des Filtrates.

c) Vergleich der Filtrationsergebnisse mit den Anfärbungen pflanzlicher Membranen.

Es ergibt sich aus den erwähnten Färbe- und Filtrationsversuchen eindeutig, daß die Farbstofflösungen zwei verschiedenfärbende Individuen enthalten müssen. Es erhebt sich nun die Frage, wieweit sich die festgestellten verschiedenen Komponenten unterscheiden. Sie können

a) von verschiedenem Chemismus sein, oder
b) verschiedene Größe der Teilchen aufweisen.

Sollten sich die zwei Bestandteile durch ihren Chemismus unterscheiden, so würden die betreffenden Originalfarbstoffe Gemische darstellen. Unter diesen Umständen würde die Charakterisierung « metachromatisch » für diese Verbindungen nicht mehr der Definition entsprechen. Handelt es sich jedoch um heterodisperse Systeme, so sollen sie nach der Farben-

dispersitätsregel von Wo. Ostwald (1911, 1912) verschieden große Teilchen enthalten (Haller 1921). Mit zunehmender Teilchengröße ändert sich nach dieser Regel die subjektive Farbe von Gelb über Orange, Rot, Violett nach Blau. Danach würden also in einer Lösung von Benzoazurin kleine rote Teilchen und größere blaue Teilchen des Farbstoffes vorhanden sein. Nach der Theorie von Schwarz (1924) und Czaja (1930) färben sich die Zellwände auf Grund der verschiedenen Porengröße unterschiedlich an, weil eben die Lückengröße den Durchmesser der färbenden Teilchen bestimmt. Wenn nun auch eine Reihe von Autoren (Ohara 1933, Ruge 1937, Ziegenspeck 1941, Griffioen 1938) die verschiedene Anfärbung der Zellwände auf diesen Poreneffekt zurückführen, fehlt es doch nicht an Autoren, welche diese Theorie anzweifeln (Bank und Bungenberg de Jong 1939).

Vergleicht man die Ergebnisse der Färbeversuche mit denen der Filtrationen, so fällt auf, daß sich die einzelnen Farbstoffe beim Durchtreten durch Filter verschiedener Porengröße sehr unterschiedlich verhalten, während im Gegensatz dazu die Resultate der Färbungen sehr gleichmäßig ausfallen. Die Ultrafiltration ergibt, daß die Teilchengröße der zellulosefärbenden Komponenten der geprüften Farbstoffe stark variieren kann. Bei einzelnen Farbstoffen wäre sie an Hand der Ergebnisse sogar kleiner als diejenige der holzanfärbenden Teilchen anderer Farbstoffe.

Die Anfärbung der Filter in der Farbe des Filtrates steht ebenfalls im Widerspruch zu der Ultrafiltrationstheorie. Anderseits ist es bekannt, daß bei der Färbung von Fasern die Affinität der innern Oberfläche zu den Farbstoffteilchen für die Färbung maßgebend ist (Mark 1930). Die von mir verwendeten Ultrafilter aus regenerierter Kollodiumwolle weisen lipophile Eigenschaften auf, und es besteht die Möglichkeit, daß die Ursache des Filtrationswiderstandes gegenüber den zellulosefärbenden Farbstoffteilchen hier zu suchen ist.

Verschiedener Chemismus der beiden Komponenten schließt natürlich den Fall nicht aus, daß die Teilchen der holzanfärbenden Komponente kleiner sind als die Teilchen der andern Komponente. Die Variation der Teilchengröße in den Lösungen soll in einem besondern Abschnitt diskutiert werden.

2. Die Dispersität der Farbstofflösungen.

a) Bisherige Untersuchungen über Benzidinfarbstoffe.

Um etwas über die Größe der Farbstoffteilchen in der wässerigen Lösung aussagen zu können, genügt es nicht allein, die chemische Strukturformel des Farbstoffes zu kennen, sondern auch seine *Dispersität*.

Die wässerigen Lösungen der käuflichen Benzidinfarbstoffe zeigen im allgemeinen den Tyndalleffekt, woraus man schließen kann, daß diese Lösungen kolloidaler Natur sind. Die meisten Autoren (Freundlich 1922, Liesegang 1932, Morton 1935, Valkó 1937 usw.) sind der Ansicht, daß sich die Moleküle der substantiven Farbstoffe im allgemeinen zu Aggregaten vereinigen. Bis jetzt wurden nur selten optisch leere Lösungen dieser Farbstoffgruppe beobachtet (Robinson 1935, Valkó 1937). In diesen Fällen handelte es sich jeweils um ganz reine Farbstoffe.

Die Aggregation (und damit die Teilchengröße) hängt von verschiedenen Faktoren ab. Die weitaus größte Bedeutung für die Veränderung der Dispersität und somit der Teilchengröße kommt der Beimengung von Neutralsalzen zu. Für die Bestimmung des Dispersitätsgrades der Farbstofflösungen ist es unerläßlich, von äußerst salzfreien Farbpulvern auszugehen. Dabei findet man überraschenderweise, daß solche Lösungen dann optisch leer erscheinen, d. h. daß sie molekulardispers sind (Robinson 1935).

Im Gegensatz zu der obenerwähnten Theorie von Schwarz, Ziegenspeck, Czaja und Haller wird aber bei diesen Dispersitätsänderungen nie eine Veränderung des Farbtones der Lösungen beobachtet.

Morton (1935) ist der Meinung, es handle sich bei der Lösung der substantiven Farbstoffe um ein heterodisperses System, dessen Zustand bei Berücksichtigung der Temperatur und des Salzgehaltes in einer Formel genau umschrieben werden könne. Danach sind in der Lösung Teilchen von allen Größenordnungen (molekulardispers bis grobdispers) in einem gewissen Gleichgewicht vorhanden. Werden nun von den kleinsten Teilchen aus der Lösung weggenommen, so werden diese sofort durch Zerfall größerer Partikel ersetzt. Für seine Versuche verwendet dieser Autor nur allerreinste Farbstoffe. Er beschreibt nie eine Veränderung des Farbtones bei Veränderung der Dispersität etwa durch Temperatureinfluß oder durch Veränderung des Salzgehaltes. Diese Ergebnisse stehen somit auch im Gegensatz zu der Theorie Czajas.

Um die Wirkung geringster Neutralsalzmengen auf die Dispersität einiger Farbstoffe zu zeigen, sind in Tabelle 6 einige Zahlenwerte, die dem Werke Valkós entnommen wurden, zusammengestellt. Die in dieser Tabelle enthaltenen Werte wurden aus Diffusionsbestimmungen errechnet. Sie zeigen, daß sowohl geringe Erhöhungen der Konzentration des Farbstoffes wie auch derjenigen des Salzgehaltes schon Teilchenvergrößerung zur Folge haben. Die drei aufgeführten Farbstoffe zeigen starke Unterschiede in ihrem Assoziationsgrad bei der gleichen Konzentration. Vom Benzopurpurin und vom Kongorot ist die Neigung

zu sehr starker Assoziation bekannt. Die übrigen von mir verwendeten Farbstoffe scheinen sich ähnlich wie Chicagoblau 6 B zu verhalten.

Die von mir der Ultrafiltration unterworfenen Lösungen der käuflichen Farbstoffe enthielten 0,1 % Farbstoff und Salz zusammen, so daß der Farbstoffgehalt ungefähr 0,02—0,04 %, der Salzgehalt entsprechend 0,08—0,06 % betragen hat. Aus Tabelle 6 kann deshalb der Assoziationsgrad und die Teilchengröße für die verwendeten Farbstoffe ungefähr abgeschätzt werden. Der Assoziationsfaktor wird dabei etwa 10—20 sein, der Teilchenradius zwischen 10 und 20 Å variieren.

Tabelle 6.

Teilchengröße der Farbstoffe bei verschiedenem Salzgehalt. (Aus Valkó.)

Gewichtskonzentration des Farbstoffes in %	Äquivalentkonzentration von NaCl n	Teilchenradius in Å	Molgewicht der Teilchen	Assoziationsfaktor
Benzopurpurin 4 B		Molgewicht des Farbions: 678		
0,005	0,01			
0,001	0,01	10,1	3 920	6
0,002	0,02			
0,05	0,02			
0,01	0,02	11,3	5 490	8
0,02	0,02			
0,03	0,03	21,6	38 400	50
0,02	0,05	40,4	251 000	400
Kongorot		Molgewicht des Farbions: 652		
0,005	0,01	12,0	6 280	9
0,005	0,02			
0,01	0,02	12,8	7 990	12
0,01	0,05			
0,02	0,05	14,0	10 400	15
0,05	0,1	15,7	14 700	20
Chicagoblau 6 B		Molgewicht des Farbions: 900		
0,002	0,01	8,7	2 500	3
0,005	0,02			
0,02	0,02	10,1	3 920	4
0,02	0,05			
0,02	0,01	11,4	5 640	6
0,02	0,2	15,5	14 100	15
0,02	0,5	17,3	19 700	22
0,05	0,5	20,6	34 000	37

Ein weiterer Faktor, der die Teilchengröße ebenfalls stark beeinflußt, ist die Temperatur. Hohe Temperaturen (bis 90°) bedingen eine

starke Erhöhung der Dispersität der substantiven Farbstoffe. Doch spielt dies in der mikroskopischen Technik keine große Rolle, da meistens bei Zimmertemperatur gefärbt wird.

Bis jetzt wurden immer Farbstoffe in wässeriger Lösung betrachtet. Doch lassen sich die Farbpulver auch in Gemischen von Wasser und organischen Lösungsmitteln mehr oder weniger gut in Lösung bringen (siehe weiter unten!). Auch dadurch wird bestimmt eine ganz andere Dispersität erreicht, doch liegen darüber keine Arbeiten vor, da die Färbungen mit Benzidinfarbstoffen eben meist in wässerigen Lösungen vorgenommen werden.

Über die Morphologie der Molekülaggregate dieser Farbstoffe liegen von Valkó (1937) ausführliche Angaben vor. Danach haben die Moleküle der meisten Benzidinfarbstoffe die Gestalt flacher Täfelchen, deren mittlere Größe ungefähr 27/7/3 Å beträgt. Form und Größe wurden röntgenographisch bestimmt. Der Aufbau der Aggregate ist nach Valkó von Farbstoff zu Farbstoff verschieden. Die tafelförmigen Moleküle können sich irgendwie balken- oder bandartig hintereinanderlegen, wobei sie sich unter Umständen gegeneinander verdrehen, je nach den elektrostatischen Kräften, die in den einzelnen Molekülen wirksam sind (Frey-Wyßling und Weber 1942).

b) Vergleich der bisherigen Ergebnisse mit der Theorie der metachromatischen Färbung.

a Größenordnung und Teilchenvergrößerung durch Aggregation und ihre Beziehung zu den Ergebnissen der Ultrafiltration.

Nach den Untersuchungen Valkós läßt sich die *Größenordnung der Aggregate* in den wässerigen Lösungen der Farbstoffe mit derjenigen der *Porenweite* der Ultrafilter vergleichen.

Aus Tabelle 6 ergibt sich z. B. für Benzopurpurin 4 B ein maximaler Teilchendurchmesser von 80 Å. Nehmen wir weiter an, daß dies nach Czaja (1930) die großen Teilchen der zellulosefärbenden Komponente des Farbstoffes darstellen. Es ist nun vollkommen unverständlich, wie diese Aggregate von einem Filter mit einem mittleren Durchmesser der Poren von 200 Å zurückgehalten werden sollen, wie dies bei unsern Versuchen der Fall war. Ebensowenig kann erklärt werden, wie dann Aggregate von 20 Å Durchmesser (kleine Teilchen der holzanfärbenden Komponente) von einem Filter, das Poren von ca. 40 Å Weite enthält, ohne weiteres durchgelassen werden. Ähnliche Widersprüche hat Morton (1935) festgestellt. Besonders eigentümlich erscheint auch das Verhalten von Kongorot, das durch keinen der angewandten Filter zurückgehalten wird, obschon gerade dieser Farbstoff zu starker Aggregation neigt.

Alle bisher gewonnenen Tatsachen zeigen eindeutig, daß die Zellwände nicht als « Sätze von Ultrafiltern » wirken, wie dies die Theorie von Czaja annimmt. Hieraus ergibt sich ferner, daß eine Größenmessung der Membranporen *mit Hilfe der unterschiedlichen Anfärbung* mit substantiven Farbstoffen (Ruge 1937, Griffoen 1938, Ziegenspeck 1941) *ausgeschlossen* ist.

β Farbänderung durch Aggregation.

Verfolgt man die Arbeiten, die sich mit der Dispersitätsänderung befassen, so fällt besonders auf, daß nirgends von einer Veränderung des Farbtones die Rede ist. Robinson (1935) erreicht mit den gereinigten Farbstoffen sogar molekulare Aufteilung der Farbstoffpartikel; er erwähnt aber keine Veränderung des Farbtones. Da die molekulare Dispersität ohne Farbveränderung erreicht wird, muß eine solche ihre Ursache anderweitig haben, d. h. die Wo. Ostwaldsche Farbendispersitätsregel ist für die untersuchten Farbstoffe nicht anwendbar. Auf unsere Versuche angewandt heißt das, daß *die holzanfärbende Komponente somit kein Dispersitätshomologes der Zellulose färbenden Komponente* darstellt. Es darf wohl angenommen werden, daß sich alle substantiven Farbstoffe in dieser Weise verhalten.

γ Bisherige Theorie über die Metachromasie.

Die Theorie von Schwarz, Czaja, Ziegenspeck und andern Autoren basiert auf der Feststellung, daß sich Zellwände verschiedener Art mit demselben Farbstoff verschieden anfärben. Schon die Ultrafiltrationsversuche zeigen jedoch, daß bereits vor der Anfärbung der histologischen Objekte in der Farblösung zwei verschieden gefärbte Komponenten vorhanden sein müssen. Dies schließt den Fall aus, daß die beiden Nuancen durch Reaktionen mit der Zellwand entstehen. Es besteht nun die Möglichkeit, daß es sich bei der einen Komponente um eine zufällig bei den Benzidinfarbstoffen vorhandene Beimischung handelt, die durch die Herstellungsweise der Farbstoffe bedingt ist. Schramek (1940) weist darauf hin, daß die Farbstoffe dieser Klassen nicht reine Individuen sind, und daß durch Dialyse aus blauen Farbstoffen eine rote Komponente gewonnen werden kann, die sich als der entsprechende Monazofarbstoff erwiesen hat. Dieser Autor hat durch Diffusionsmessungen bestätigt, daß die Aggregate dieser roten Komponente kleiner sein müssen als diejenigen der blauen Komponente.

Da durch den Unterschied in der Teilchengröße die Ursache der unterschiedlichen Anfärbung der Zellwände nicht erklärt werden kann, soll geprüft werden, ob möglicherweise die verschiedene Affinität der Komponenten zu der innern Oberfläche der Zellwände dafür verantwortlich gemacht werden kann.

C. Hydrophile und lipophile Eigenschaften der Farbstoffe.

1. Trennung der Farbstoffe durch Ausschütteln.

Durch Lösungsmittel mit hydrophilen, resp. lipophilen Eigenschaften soll versucht werden, die Auslese der Farbstoffkomponenten aus der ursprünglichen Farbstoffkombination, wie sie bei der Gewebefärbung vermutlich stattfindet, im Modellversuch nachzuahmen. Dazu eignet sich am besten die *Ausschüttelungsmethode.*

a) Methode.

Das Ausschütteln der wässerigen Farbstofflösung wurde für die Versuche im kleinen im Reagenzglas vorgenommen, bei größern Mengen wurde mit Vorteil ein Scheidetrichter (bis zwei Liter) verwendet. Die wäßrige Lösung des Farbstoffes wurde mit gleichviel organischem Lösungsmittel, mit dem die Trennung vorgenommen werden sollte, gut ausgeschüttelt und einige Zeit stehengelassen, bis sich wieder zwei Schichten gebildet hatten. Starke Schaumbildung beim Ausschütteln ist zu vermeiden.

Die Lösungsmittel sollen mit Wasser nicht mischbar sein. Viele Verbindungen, die sich mit Wasser kaum oder nur sehr wenig mischen, zeigten sich als ungeeignet, so:

Äther	Schwefelkohlenstoff
Amylazetat	Chloroform
Benzol	Paraffinöl
Toluol	

Diese Lösungsmittel wurden aber trotzdem schon zum Ausschütteln verwendet (Bungenberg de Jong und Bank 1940), dabei wurden sie jedoch mit polaren Zusätzen, wie Anisaldehyd, Anilinchlorid usw. versehen.

Lösungsmittel, die selbst schon polaren Charakter haben, sind die Alkohole $C_n H_{2n+1} OH$. Für die Ausschüttelungsmethode kommen diejenigen in Frage, die sich mit Wasser nicht vollständig mischen. Schon Butylalkohol genügt dieser Anforderung, es zeigte sich aber, daß sich der Amylalkohol noch besser eignet. Die Löslichkeitsverhältnisse der beiden Alkohole sind in Tabelle 7 zusammengestellt.

Tabelle 7.

Löslichkeitsverhältnisse von Butyl- und Amylalkohol in Wasser.

	Butylalkohol	Amylalkohol
Wasser löst bei Zimmertemperatur	19 %	9 %
Vom Alkohol wird Wasser aufgenommen . .	8 %	4 %

Vollständige Wasserunlöslichkeit schließt bei solchen kurzen Ketten die Polarität aus, so daß eine kleine gegenseitige Löslichkeit in Kauf genommen werden muß. Dadurch können die durch Zusätze verunreinigten Lösungsmittel, wie sie Bungenberg de Jong und Bank (1940) angewendet haben, umgangen werden.

Die als ungeeignet befundenen Lösungsmittel wie Äther usw. scheinen zu stark lipophilen Charakter zu haben. Für die erfolgreiche Ausschüttelung scheint ein Lösungsmittel von polarem Charakter, das lipophil ist, jedoch noch hydrophile Eigenschaften aufweist (Amylalkohol, Benzol mit polaren Beimengungen) notwendig zu sein.

b) Ausschüttelung der geprüften Farbstoffe und Farbstofftrennung.

Wird z. B. Benzoazurin im Reagenzglas mit Amylalkohol ausgeschüttelt, so bleibt die wässerige Schicht blau, die darüberstehende Schicht von Amylalkohol nimmt den Farbton der roten Komponente an. In Tabelle 8 sind die Ergebnisse der Ausschüttelungsversuche mit den verschiedenen Farbstoffen zusammengestellt.

Tabelle 8.

Zusammenstellung der Ausschüttelungsversuche.

Farbstoff	Farbe der wäßrigen Lösung	Farbe des Amylalkoholauszuges
Benzoazurin standardisiert	blau mit rötlichem Ton	schwächer bis stärker rot
Oxaminblau 4 R		
Benzoazurin 3 R		
Azoblau		
Brillantkongoblau 2 RW . .		
Dianildunkelblau R		
Benzopurpurin 4 B	karminrot	zinnoberrot
Kongorot		

Der Amylalkohol enthält trotz der großen *Intensität* der Färbung nur eine geringe Menge des Farbstoffes. Wenn man von einer Stammlösung von 1 ‰ ausgeht, so nimmt der Amylalkohol ca. 0,02 ‰ Farbstoff auf. Diese Werte gelten für Benzoazurin und Kongorot. Sie wurden einerseits durch Abdampfen des Amylalkohols und Wägen des Rückstandes, anderseits durch angenäherte Konzentrationsmessung mit dem Pulfrich-Stufenphotometer bestimmt. Diese 0,02 ‰ würden nach Einberechnung des Salzgehaltes des Ausgangsmaterials ungefähr $^1/_{20}$ der wirklichen Farbstoffmenge betragen. Bei der Ultrafiltration wurden für die entsprechenden Komponenten ungefähr dieselben Mengen erhalten (S. 34).

Der Rückstand, der nach dem Eindampfen des Amylalkohols erhalten wird, und der zur Hauptsache aus der lipophilen Farbstoffkomponente besteht, ist in Wasser löslich. Die Lösung ist aber nicht beständig; nach ca. 10 Tagen fällt der Farbstoff bei Zimmertemperatur aus.

Die verbleibende wässerige Lösung ist bei « Benzoazurin standardisiert » etwas blauer im Ton als die ursprüngliche Flotte. Mit dem Pulfrich-Photometer ist die Veränderung gerade noch feststellbar (s. weiter unten!). Die Lösung enthält aber immer noch roten Farbstoff. Bei *mehrmaligem* (bis fünfmal) Ausschütteln von Benzoazurin wurde unter ständiger Abnahme der Farbintensität der Farbton des Amylalkohols allmählich etwas blau. Beim Auswaschen des abgetrennten Amylalkohols mit Wasser geht aber die blaue Farbe sofort in das Waschwasser zurück. Es ist möglich, daß durch die 9 % Amylalkohol, welche nach dem Ausschütteln in der wässerigen Lösung zurückgeblieben sind, noch etwas roter Farbstoff in der wässerigen Schicht zurückgehalten wird. Man kann sich auch vorstellen, daß durch die blauen Farbstoffteilchen ein Teil der roten Komponente zurückgehalten wird. Dies wird vor allem im Moment der Sättigung der amylalkoholischen Lösung eintreten. In gleicher Weise läßt sich das Übertreten von blauen Teilchen in den Amylalkohol erklären. Nach längerem Stehen fallen diese jedoch wieder aus.

c) Vergleich der Ausschüttelungsversuche mit den Färbungen histologischer Objekte.

Die Gegenüberstellung der Tabellen 2 und 8 ergibt eine klare Bestätigung unserer eingangs aufgestellten Arbeitshypothese :

Die in den Ausschüttelungsversuchen als hydrophil festgestellten Farbstoffkomponenten besitzen denselben Farbton, wie er in den hydrophilen Zellulosemembranen ausschließlich beobachtet wird;

die im Amylalkohol gelösten, lipophilen Farbstoffanteile stimmen in ihrer Farbe ausschließlich mit der Tönung der verholzten, also lipophilen Zellwände überein.

Man ist deshalb berechtigt, die aufgezeigten Farbstoffkomponenten als hydrophil resp. lipophil zu bezeichnen.

Das Vermögen der Zellwände, eine analoge Komponententrennung vorzunehmen, wie sie im Ausschüttelungsversuch mit Wasser und Amylalkohol durchgeführt wird, scheint durch die Eigenschaften der inneren Membranoberflächen bedingt zu sein. Denn in den submikroskopischen Intermizellarräumen muß die Hydrophilie resp. Lipophilie sehr ausgesprochen zutage treten. Es kann sogar festgestellt werden, daß z. B. Benzoazurinlösungen durch die Zellwände sauberer zerlegt werden als durch den Ausschüttelungsversuch : laut Tabelle 2 nehmen Zellulosezellwände in diesem Farbstoff einen reinen azurblauen Ton an, während der wässerige Auszug laut Tabelle 8 immer noch einen Stich ins Rötliche besitzt, der durch lipophile Teilchen erzeugt wird.

Im Abschnitt über die Herstellung von Dauerpräparaten wurde darauf hingewiesen, daß sich die Alkoholstufen (Äthylalkohol) auf die

Tabelle 9.

Löslichkeit der substantiven Farbstoffe in absolutem Äthylalkohol.

Farbstoff	Löslichkeit	Farbe
Benzoazurin standardisiert .	+	rötlich
Benzoazurin 3 R	++	tief rot
Chicagoblau 4 R	++	tief rot
Dianildunkelblau R	±	fast farblos
Dianilschwarz N	+	rötlich
Columbiaschwarz FF extra .	+	rötlich

substantiven Färbungen ungünstig auswirken, da durch 70 % Alkohol die lipophile Komponente ausgewaschen wird. Die verschiedenen Farbstoffe wurden auf Grund dieses Befundes auf ihre Löslichkeit in absolutem Äthylalkohol geprüft. Auch Robinson (1935) verwendet zum Entfernen des Na-Azetates aus Farbpulvern Äthylalkohol, durch den dann wahrscheinlich zugleich auch die lipophile Komponente restlos aus dem Farbstoff entfernt wird. Die hydrophile Komponente löst sich im Äthylalkohol erst bei geringer Zugabe von Wasser. Der nächsthöhere Alkohol Propanol verhält sich etwas anders, indem das wasserfreie Produkt keine der beiden Komponenten zu lösen vermag, bei geringer Wasserzugabe wird die rote Komponente gelöst, bei stärkerer Wasserzugabe nähert sich der Farbton immer mehr demjenigen der wässerigen Lösung, wie dies die Zusammenstellung in Tabelle 10 zeigt. Die Auswertung dieser Beobachtungen erfolgt in einem spätern Abschnitt dieser Arbeit.

Tabelle 10.

Farbe der Propylalkohollösungen von Benzoazurin standard. bei verschiedener Alkoholkonzentration.

Konzentration des Propylalkohols in %	Farbe der Lösung
100	farblos, nichts gelöst
95	rotviolett, sehr wenig gelöst
90	rotviolett, viel weniger als 0,5 ‰ gelöst
80	rotbläulich, 0,5 ‰ werden noch nicht gelöst
70	stark rotstichiges Blau
60	blauviolett
40	der Farbton nähert sich immer mehr demjenigen der wäßrigen Lösung
20	
0	blau, rotstichig

Aus diesen Versuchsergebnissen geht hervor, daß offenbar schon 70 % Äthylalkohol lipophilere Eigenschaften aufweist als die verholzten Zellwände. Die Resultate zeigen auch, daß es möglich ist, die hydrophile Komponente in relativ lipophilen Flüssigkeiten zu lösen. Durch die unterschiedliche Löslichkeit desselben Farbstoffes in Äthylalkohol und n-Propylalkohol kommen die verschieden starken lipophilen Eigenschaften der beiden Alkohole deutlich zum Ausdruck.

Die Trennung des Kongorotes mit Amylalkohol scheint auf den ersten Blick Komponenten mit derselben Farbe zu ergeben, wie sie bei der Anfärbung der histologischen Präparate gefunden werden. Die hydrophile Lösung ist karmin gefärbt, wie beim Benzoazurin, jedoch kaum von der ursprünglichen wässerigen Lösung zu unterscheiden, der Amylalkoholauszug mit der lipophilen Komponente ist zinnoberrot. In Übereinstimmung damit färben sich Zellulosemembranen karmin, verholzte Zellwände zinnober. Auf S. 29 wurde die ausgesprochen gelbe Anfärbung der Steinzellen beschrieben. Demnach muß in der Farblösung auch eine gelbe Komponente vorhanden sein. Da mit Benzoazurin die Lipophilie dieser Zellwände festgestellt wurde, kann es sich nur um eine lipophile Komponente handeln. Vom Amylalkoholauszug sollte deshalb erwartet werden, daß er von gelber Farbe sei. Da eine Mischung von Gelb und Karminrot einen zinnoberroten Farbton ergibt, scheint es, daß der Amylalkohol (wie auch die zinnoberrot gefärbten verholzten Zellen) auch noch von der hydrophilen Komponente enthalten. Dies würde darauf hindeuten, daß auch die wasserlösliche Komponente des Kongorotes nicht so stark hydrophil ist wie diejenigen der übrigen Farbstoffe.

Ebenso kann man feststellen, daß Kongorot von Alkohol relativ leicht aus den Zellulosemembranen ausgewaschen wird, was bei den andern substantiven Farbstoffen wie Benzoazurin, Oxaminblau, Brillantkongoblau nicht der Fall ist. Auch hieraus kann geschlossen werden, daß die rote Komponente dieses Farbstoffes etwas weniger hydrophilen Charakter besitzt als die der andern Farbstoffe.

Der Versuch, die gelbe Komponente des Kongorotes rein zu erhalten, soll in einem weitern Abschnitt (« Adsorptionsmethoden zur Trennung ») zur Sprache kommen. Vorerst sollen noch die Schnittfärbungen mit den durch die Ausschüttelungsmethode gewonnenen Komponenten zur Sprache kommen.

d) Färbungen mit den durch Ausschütteln getrennten Farbstoffen.

Das durch Ausschütteln erhaltene Farbpulver der lipophilen Komponente des Benzoazurins (S. 41) wurde in Wasser aufgelöst (ca. 2 mg in 5 cm^3), um zur Schnittfärbung Verwendung zu finden. Dieser Weg wurde beschritten, um im üblichen Medium zu färben. Die Schnitte von

Ilex Aquifolium zeigten nach kurzer Färbedauer (1—2 Tage) schon eine ziemlich intensive rotviolette Anfärbung aller verholzten Zellen, die Steinzellen werden etwas weniger stark gefärbt.

Die Versuche, Schnitte mit den Amylalkohollösungen zu färben, hatten bei längerer Färbedauer ebenfalls Erfolg. Nach 6 bis 8 Tagen waren die verholzten Zellen schon gut angefärbt, mindestens gleich intensiv wie die mit wässeriger Lösung gefärbten Schnitte.

Nach längerem Einwirken (10—15 Tage) oder bei Verwendung eingeengter Farbstofflösungen war die Anfärbung der verholzten Zellen sehr stark. Die Zellulosemembranen nahmen in einigen Fällen, wo die Schnitte mit so konzentrierten Amylalkohollösungen gefärbt worden waren, etwas Farbstoff auf. Im Verhältnis zu den verholzten Zellen ist aber die Färbung sehr gering.

Es erstaunt nicht, daß auch die Zellulosemembranen eine gewisse Menge lipophilen Farbstoffes festhalten, denn dies wurde auch schon bei der gewöhnlichen Färbung mit Benzoazurin in wässeriger Lösung festgestellt. Vergleicht man Schnitte, die nur mit Wasser, und solche, die mit 70 % Alkohol ausgewaschen wurden, so fällt der klarere Ton der Zellulosewände nach der Alkoholbehandlung sofort auf. Der immer noch etwas rötliche Ton der Zellulosewände nach dem Auswaschen mit Wasser zeigt, daß eine kleine Menge der roten Komponente aufgezogen hat.

Die ausgesprochene Bevorzugung der verholzten Zellen durch die rote Komponente des Benzoazurins ist äußerst eigentümlich, wenn man die Resultate der Ultrafiltration damit vergleicht. Wenn die roten Farbstoffteilchen kleiner sind als die blauen und die Ursache der unterschiedlichen Färbung auf die Teilchengröße zurückgeführt werden soll, bleibt es unklar, weshalb diese roten Teilchen nicht auch die mit der blauen Komponente gefärbten Zellwände färben sollten. Die Größe der Membranporen würde ja den Eintritt der Teilchen in die Zellwand ohne weiteres gestatten.

Auch findet eine eigentliche Filterwirkung nicht statt, wie sie z. B. mit der Ultrafilternutsche erzwungen wird, wobei man doch mit einem Unterdruck von 15 mm Hg arbeitet, um die Trennung der Komponenten zu erreichen.

Nach dem Gesagten scheint es plausibler, die Anfärbung auf die *Affinität* der Zellwände zu den Farbstoffen zurückzuführen.

Farbstoffe, deren Komponenten sich in ihren lipophilen und hydrophilen Eigenschaften nicht stark unterscheiden, bieten der Trennung mit der Ausschüttelungsmethode Schwierigkeiten (Kongorot). Die Trennung muß so erfolgen, daß eine der Komponenten durch Adsorption aus der Lösung entfernt wird.

2. Adsorptionsmethode zur Trennung.

a) Methode.

Um die hydrophile Komponente aus der Farbstofflösung zu entfernen, erschien es am günstigsten, die hydrophilen Teilchen auf reine Zellulose aufziehen zu lassen, bis die Restlösung nur noch lipophile Teilchen enthält. Für die wässerige Lösung war dies jedoch mit Schwierigkeiten verbunden, da der Farbstoff in absehbarer Zeit nicht restlos aus der Flotte herauszubringen war, abgesehen davon, daß immer kleine Mengen von der lipophilen Komponente mitgeschleppt wurden. Aus den Lösungsversuchen von Benzoazurin in n-Propylalkohol verschiedener Konzentration fiel mir auf, daß sich nach mehrwöchigem Stehen die Farbtöne der Lösungen von höhern Propylalkoholkonzentrationen (60, 80 %) ziemlich stark gegen Rot verändert hatten, wobei sich ein Bodensatz — offenbar die zum Teil ausgefallene blaue Komponente — gebildet hatte. Beim Filtrieren einer derartigen Lösung durch ein Papierfilter färbte sich dieses spontan intensiv blau, während die Lösung von ziemlich reiner roter Farbe war. Es schien vorteilhaft, eine Methode auf Grund dieser Erfahrungen aufzubauen, um die lipophile Komponente auf diese Weise rein zu gewinnen.

In einem Kölbchen mit eingeschliffenem Stopfen wurden 100 cm³ propylalkoholische Farbstofflösung mit einem Gramm entfetteter Watte versehen. Die Konzentration des n-Propylalkohols betrug 80 %, die Farbstoffkonzentration 0,5 % (eine gesättigte Farbstofflösung enthält bei 20° C 0,7 % Farbstoff). Das Kölbchen wurde mit der Watte 5—7 Tage stehengelassen. Dann wurde die Watte unter gutem Auspressen aus dem Kölbchen entfernt und durch gleichviel neue ersetzt. Nach sechs- bis achtmaligem Wechsel schienen die Farbstoffe genügend gereinigt.

b) Die Komponententrennung von Benzoazurin und Kongorot.

Mit der beschriebenen Methode ließ sich die lipophile Komponente sowohl des Benzoazurins wie auch des Kongorots gut abtrennen.

Der im Propylalkohol gelöste Farbstoff der lipophilen Komponente des Benzoazurins war von rotvioletter Farbe. Das durch Eindampfen erhaltene Farbpulver ist rot gefärbt, in Alkohol relativ leicht, in Wasser nur wenig löslich. Die wässerige Lösung zeigt starken Tyndalleffekt, die Lösung ist demnach grobdispers. Die Konzentration (inklusive Salzgehalt) wurde durch Eindampfen und Wägen des Rückstandes bestimmt und betrug ca. 0,05 %, d. h. etwa $^1/_{10}$ der ursprünglichen Farbstoffmenge. Dieser Anteil der lipophilen Komponente im Originalfarbpulver wurde auch bei den Ausschüttelungsversuchen erhalten. Bei jenen Versuchen enthielt die Lösung nach fünfmaligem Ausschütteln nur noch sehr wenig Rot. Wenn pro Trennung ca. 0,002 % an rotem Farbstoff aus der Lösung entfernt worden waren, so ergäbe dies eine Menge von 0,01 % bei einer ursprünglichen Konzentration von 0,1 %,

oder wiederum ca. $^1/_{10}$ der ursprünglichen Menge Farbstoff (inklusive Salzgehalt).

Bei der Trennung des Kongorots mußte die Baumwollwatte zur Adsorption der karminroten Farbstoffkomponente einige Male mehr gewechselt werden, bis von der Watte nur noch Spuren von Farbstoff aufgenommen wurden. Eine Lösung des Kongorotfarbstoffes in 90 % Propylalkohol hätte sich besser zur Trennung geeignet. Da aber das Benzoazurin in dieser Alkoholkonzentration nicht mehr in genügender Menge in Lösung geht, mußte die Konzentration von 80 % beibehalten werden, um vergleichbare Resultate zu erhalten.

Mit der Adsorptionsmethode gelang es nun, die gesuchte gelbe Komponente aus dem Kongorot zu gewinnen, die bei der Färbung der Steinzellen in Querschnitten von *Ilex* beobachtet wird. Die Konzentration (photometrisch bestimmt) beträgt für diesen gelben Anteil etwa 0,04 % bei einer Ausgangskonzentration von 0,5 %, d. h. ungefähr $^1/_{12}$ der gesamten Farbstoffmenge.

Die lipophile gelbe Komponente des Kongorots ist eigentümlicherweise säurefest, während das Kongorot selbst äußerst säureempfindlich ist (Blaufärbung und Ausfällung). Durch 2 n HCl wird die Farbe der isolierten lipophilen Komponente des Kongorots in keiner Weise verändert. Daraus kann geschlossen werden, daß diese lipophile Komponente chemisch nicht identisch mit der hydrophilen Komponente ist. Das Originalfarbpulver stellt also möglicherweise ein Gemisch dar.

Die Absorptionskurven der lipophilen Komponenten von Benzoazurin und Kongorot wurden mit dem Pulfrich-Stufenphotometer ausgemessen. Die Resultate sind in einem späteren Abschnitt wiedergegeben.

c) Färbung von histologischen Präparaten mit den lipophilen Komponenten von Benzoazurin und Kongorot.

Als Farblösung diente der nach Verdampfen des Propylalkohols erhaltene Rückstand, von welchem 2 mg in 5 cm³ Wasser gelöst wurden. Als Testobjekt verwendeten wir wiederum Querschnitte von *Ilex Aquifolium*. Die Ergebnisse nach zwei bis fünf Stunden Färbedauer sind in Tabelle 11 zusammengestellt.

Alle verholzten Zellen der mit der lipophilen Komponente des Benzoazurins gefärbten Schnitte waren rot gefärbt, wie es von den Versuchen mit der ursprünglichen wässerigen Lösung bekannt war. Die Zellulosewände waren nicht oder nur wenig gefärbt. Die schwache Anfärbung rührt sicher von restlichem hydrophilem Farbstoff her.

Die lipophile Komponente des Kongorots färbt alle verholzten Zellen gelb. Das Gelb ist identisch mit demjenigen der Steinzellen bei der auf S. 29 beschriebenen Färbung mit Kongorot. Unterschiedlich von der Färbung mit wässeriger Lösung des Originalfarbstoffes ist die Tin-

Tabelle 11.

Färbung von *Ilex Aquifolium* mit den isolierten lipophilen Komponenten von Benzoazurin und Kongorot.

	Kongorot	Benzoazurin
Zellulose-Membranen . .	einzelne Zellen schwach karmin	einzelne Zellen sehr schwach blau
Kutikula	schwach gelb	schwach gelb, innerste Schicht schwach rötlich
Bastfasern . . . . . Xylem . . . . . Steinzellen	satt gelb	violettstichiges Rot

gierung der Zellen des Xylems und der Bastfasern des Perizyklus. Sonst von zinnoberroter Farbe, werden sie mit der isolierten lipophilen Komponente gelb gefärbt. Der zinnoberrote Ton entsteht offenbar durch Mischung der lipophilen und hydrophilen Komponente. Die zinnoberrote Farbe der Amylalkoholschicht bei den Ausschüttelungsversuchen muß dann ebenfalls als Mischfarbe der beiden Komponenten gedeutet werden, wobei anzunehmen ist, daß die hydrophile Komponente zum Teil in das lipophile Lösungsmittel wandert. Dies würde aber bedeuten, daß die zellulosefärbende Komponente des Kongorots etwas weniger hydrophil wäre als die entsprechende Komponente der übrigen untersuchten Farbstoffe. Diese Annahme wird durch die bessere Löslichkeit des Kongorots gegenüber den andern Farbstoffen in Propylalkohol bestätigt.

Mit der Lösung der lipophilen Komponente des Kongorots wird, wie beim Benzoazurin, ein Teil der Zellulosemembranen schwach in der Farbe der hydrophilen Komponente gefärbt, was auch hier auf die noch nicht ganz entfernte hydrophile Komponente zurückzuführen ist.

d) Adsorption der lipophilen Farbstoffkomponente.

Um die *hydrophile* Komponente aus der Farbstofflösung rein zu gewinnen, wurde versucht, durch Adsorption die lipophile Komponente aus der Lösung zu entfernen.

Von Ruggli und Jensen (1935) liegt eine Arbeit vor, in der die Trennung von substantiven Farbstoffen durch *chromatographische Adsorption* aus wässerigen Lösungen beschrieben wurde. Die von den Verfassern erhaltenen Chromatogramme deuten darauf hin, daß die verwendeten Farbstoffe nicht einheitlich sind. Das Chromatogramm des Kongorots zeigt Übergänge von einer schwach rotvioletten über eine breite, rosa- bis starkrote Zone zu einer gelborangen Zone. Der aus der letztern gelborangen Zone gewonnene Farbstoff läßt sich mit Essigsäure nicht, mit 5 % HCl in eine Farblösung von rotviolettem Ton umwandeln.

Nach meinen Versuchen kann es sich beim letzterwähnten Farbstoff um die noch mit der hydrophilen Komponente verunreinigte lipophile Komponente handeln, was auch aus der Verfärbung mit HCl geschlossen werden muß.

Nach diesen Ergebnissen erschien uns diese Trennungsmethode nicht geeignet. Wir versuchten nun, die lipophile Komponente auf ähnliche Weise, wie dies bei der hydrophilen Komponente geschehen war, aus der Farblösung zu entfernen. Die Versuche mit Azetatseide, Kollodiumwolle, Nitrozellulose und Holz als Adsorbentien führten zu einem negativen Ergebnis. Der lipophile Farbstoff wurde in zu geringem Maß von diesen Substanzen aufgenommen. Mit Benzoazurin wurden Kollodiumwolle und Azetatseide rotviolett gefärbt, so daß der Farbton anzeigte, daß auch die hydrophile Komponente zum Teil auf die Faser aufgezogen war.

Es ist überhaupt fraglich, ob die Abtrennung der lipophilen Komponente mittels Adsorption gelingen kann. Es besteht nämlich die Möglichkeit, daß die lipophile Komponente von den Teilchen der hydrophilen Komponente adsorbiert wird (Freundlich 1922), sofern die Oberflächenbeschaffenheit der letztern sich hierfür besser eignet als diejenige eines Adsorbens.

Schließlich versuchte ich noch eine Trennung der Komponenten mit aktiver Kohle vorzunehmen (Michaelis und Rona 1919). Die Kohle adsorbiert den Farbstoff vollständig. Es sollte nun möglich sein, eine oder beide Komponenten einzeln durch Lösungsmittel oder Lösungsmittelgemische wieder von der Kohle abzulösen (Steenberg 1941). Leider gelang nur ein einziger Versuch, wobei eine kleine Menge der blauen Komponente des Benzoazurins gewonnen werden konnte. Diese Lösung zeigte den üblichen Stich ins Rote nicht mehr. Ihre Absorptionskurve ist in Figur 6 (Z_2) dargestellt.

Von dem an Kohle adsorbierten Kongorotfarbstoff konnten die Komponenten nicht einzeln desorbiert werden.

Mit Hilfe der bisherigen Versuche konnte *qualitativ* ziemlich weitgehend sichergestellt werden, daß die untersuchten Farbstoffe tatsächlich zwei verschiedene Komponenten enthalten. Um endgültig zu beweisen, daß die sogenannten metachromatischen Farbstoffe Gemische verschiedener Verbindungen darstellen, muß jedoch *quantitativ* festgestellt werden, daß

1. jede der Komponenten eine typische Farbkurve besitzt;
2. die Farbverschiedenheit der Komponenten nicht von Dispersitätsunterschieden herrührt.

D. Charakterisierung der isolierten Farbstoffkomponenten durch ihre Absorptionskurven.

a) Methode.

Die Farbe einer Lösung entsteht durch selektive Adsorption des durchtretenden Lichtes (Wo. Ostwald 1924). Der Umfang der Lichtschwächung folgt den Gesetzen von Lambert und Beer.

Das *Lambertsche Gesetz* behandelt die Abhängigkeit der Lichtschwächung von der Schichtdicke des absorbierenden Mediums (Extinktion). Wächst die Schichtdicke in arithmetischer Progression, so nimmt die hindurchgelassene Lichtmenge in geometrischer Progression ab.

Das *Beersche Gesetz* beschreibt die Abhängigkeit der Lichtschwächung von der Konzentration der Lösungen und ist eigentlich eine Erweiterung des Lambertschen Gesetzes. Bei arithmetischer Progression der Konzentration nimmt bei konstanter Schichtdicke die durchgelassene Lichtmenge in geometrischer Progression ab.

Demnach lautet das *Beer-Lambertsche Gesetz:*

$$I = I_0 \cdot 10^{-\bar{k} \cdot c \cdot s}$$

I_0 Intensität des eintretenden Lichtes
I Intensität des durchgegangenen Lichtes
s Schichtdicke
c Konzentration
$\bar{k}$ «molarer Extinktionskoeffizient».

Durch Logarithmieren erhält man für den *molaren Extinktionskoeffizienten:*

$$\bar{k} = \frac{1}{c \cdot s} \log \frac{I_0}{I} = \frac{1}{c \cdot s} E$$

E Extinktion.

Es war nicht möglich, für unsere Farbstofflösungen den molaren Extinktionskoeffizienten zu bestimmen, da von einzelnen Farbstoffen das Molekulargewicht gar nicht bekannt ist; ferner wurde von den wenigsten der Salzgehalt festgestellt, so daß überhaupt keine molare Lösung hergestellt werden konnte. Im folgenden ist stets nur vom Extinktionskoeffizienten die Rede; dieser ist aber immer, wo nichts Besonderes vermerkt ist, auf Lösungen von 1 ‰ des käuflichen Farbstoffes bezogen.

Die Gleichung für k lautet dann:

$$k = \frac{1}{s} \cdot E$$

oder bei Lösungen, die zur Messung verdünnt werden:

$$k = \frac{1}{c \cdot s} \cdot E,$$

wobei sich die Konzentration c auf die Bezugslösung von 1 ‰ bezieht.

Logarithmiert man diese Gleichung nochmals, so erhält man für log k folgenden Ausdruck:

$$\log k = \log \frac{1}{c} + \log \frac{1}{s} + \log E.$$

Der Wert für log k setzt sich somit aus additiven Einzelgrößen zusammen. Der Verlauf der Extinktionskurve ist damit von der Schichtdicke und von der Konzentration unabhängig, d. h. alle Kurven eines bestimmten Farbstoffes ver-

laufen zueinander parallel, sofern das Beer-Lambertsche Gesetz Gültigkeit hat. Diese Kurven nennt man *typische Farbkurven.*

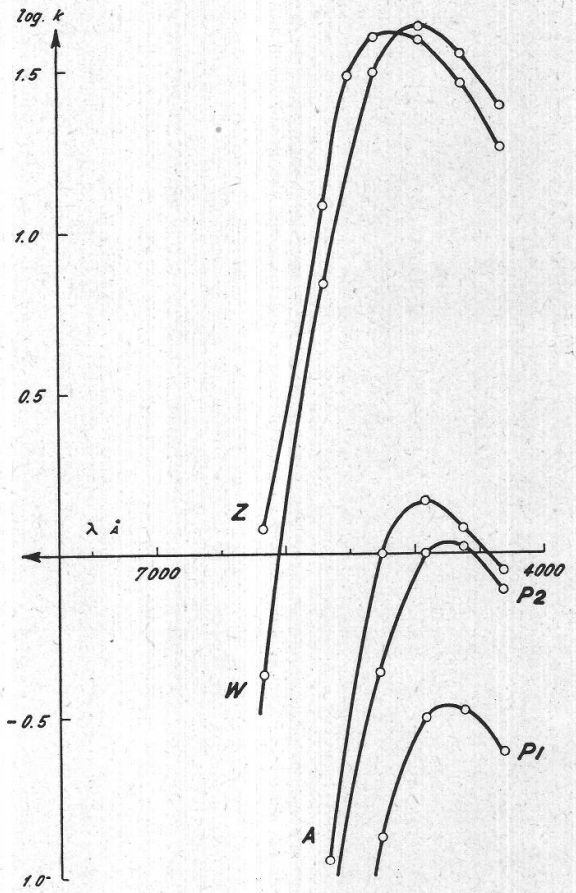
Im folgenden handelt es sich, sofern nichts Besonderes angegeben ist, immer um die Werte von log k.

Für die Messungen sollte streng genommen monochromatisches Licht verwendet werden. Beim Pulfrich-Stufenphotometer der Firma Zeiß stehen zur Messung Farbenfilter zur Verfügung, die einen kleinen Ausschnitt des Spektrums erfassen, etwa in der Breite von 200 Å. Die zur Aufnahme der typischen Farbkurven dienenden Filter gehören dem S-Filtersatz an. Ihre optischen Daten können der Zeißschen Druckschrift Meß 430 d/IV entnommen werden.

Die Abweichungen, die durch die Verwendung von Farbfiltern an Stelle von monochromatischem Licht entstehen, beeinträchtigen die Resultate nicht.

b) Typische Farbkurven von Kongorot und seinen Komponenten.

Die in Figur 4 wiedergegebene Kurve W zeigt die für eine wässerige Kongorotlösung von 1 ‰ gefundene typische Farbkurve.



Figur 4.
Typische Farbkurven von Kongorot. W wässerige Lösung, Z Zellophanstreifen, A Amylalkoholauszug, P_1 lipophile Komponente in Propylalkohol nach Trennung durch Adsorption mit Watte, P_2 wie P_1, jedoch konzentriertere Ausgangslösung.

Die zehn Meßpunkte, die das Stufenphotometer liefert, ergeben eine Absorptionskurve, die bei einer Wellenlänge von ca. 5000 Å die geringste Durchlässigkeit der Farblösungen erkennen läßt. Die Übereinstimmung mit der Absorptionskurve von Kongorot, die Heilmeyer (1939) aufgenommen hat, ist recht gut. Dabei stand diesem Autor ein Monochromator zur Verfügung, der Ablesungen von 100 zu 100 Å er-

Tabelle 12.

Absorptionsmaxima und Verschiebung derselben von einigen Farbstoffen.

Farbstoff	Absorptionsmaximum bei folgenden Wellenlängen				Verschiebung der Absorptionsmaxima			
	Wasser	Zellophan	Amyl-alkohol-auszug	Lipophile Komponente	Zellophan/ wäßrige Komponente	Wäßrige Komponente/ Amyl-alkohol-auszug	Wäßrige Komponente/ lipophile Komponente	Total Zellophan/ lipophile Komponente
	Å	Å	Å	Å	Å	Å	Å	Å
Kongorot	5000	5150	4900	4750	+ 150	— 100	— 250	400
Kongorot «Ruggli»	5000	5200			+ 200			
Kongorot «Heilmeyer» . .	4900[3]							
Benzoazurin st.	5750	5850	5300	5300	+ 100	— 450	— 450	600
Benzoazurin st.	5700[1]	5900[2]			+ 150[2]		— 50[1]	
Azoblau	5600	5750	5250		+ 150	— 350		500
Benzopurpurin 4 B	4900	5100			+ 200			

[1] Wäßrige Lösung nach dem Einlegen von Watte (siehe S. 56).
[2] Zellophanstreifen mit dem durch Trennung mit Kohle erhaltenen Farbstoff gefärbt (siehe S. 49).
[3] Nach der mit dem Monochromator von Heilmeyer (1939) aufgenommenen Kurve.

möglichte. Heilmeyer findet das Absorptionsmaximum für Kongorot bei 4900 Å.

Die typische Farbkurve der wässerigen Lösung des gewöhnlichen Kongorots wurde mit derjenigen des Kongorots « Ruggli » verglichen. Die in Tabelle 13 zusammengestellten Werte ergeben, daß die Messungen bei großen Wellenlängen nicht brauchbar sind (negative und positive Differenzen der Werte von log k). In der Nähe des Absorptionsmaximums unterscheiden sich die Werte von ($\log k_2$—$\log k_1$) nicht mehr. Im Bereich dieser Wellenlängen können somit Konzentrationsbestimmungen gemacht werden.

Tabelle 13.

Werte von k und log k für gewöhnliches Kongorot und Kongorot « Ruggli ».

Wirksamer Filterschwerpunkt λ in Å	k_1 gewöhnliches Kongorot	k_2 Kongorot „Ruggli“	$\frac{k_1}{k_2}$	$\log k_1$ gewöhnliches Kongorot	$\log k_2$ Kongorot „Ruggli“	$\log k_2 - \log k_1$
7500	0,039	0,034	—	— 1,408	— 1,471	— 0,063
7290	0,044	0,057	—	— 1,359	— 1,249	+ 0,110
6660	0,095	0,159	—	— 1,024	— 0,799	+ 0,225
6190	0,428	0,379	—	— 0,368	— 0,422	— 0,054
5720	6,9	8,15	0,846	+ 0,838	+ 0,912	+ 0,074
5500	21,5	30,1	0,714	1,333	1,479	+ 0,146
5300	31,0	46,6	0,665	1,491	1,668	+ 0,177
4940	43,3	64,4	0,688	1,636	1,809	+ 0,172
4630	35,1	50,9	0,690	1,545	1,706	+ 0,161
4340	24,3	34,7	0,708	1,386	1,540	+ 0,154

Bildet man die Quotienten der Extinktionen von gewöhnlichem Kongorot und salzfreiem Kongorot « Ruggli », so läßt sich daraus die Menge des *wirklich vorhandenen Farbstoffes* im käuflichen Produkt errechnen, wobei die Unterschiede in der Dispersität nicht berücksichtigt sind. An Hand unserer Messungen würde der käufliche Farbstoff zirka 69 % Farbstoff und zirka 31 % einer Beimengung — wahrscheinlich NaCl — enthalten.

Die lipophile Farbstoffkomponente, die sich bei der Ausschüttelung mit Amylalkohol ergibt, weist dagegen eine größte Lichtschwächung bei 4900 Å auf (Fig. 4, Kurve A). Sie zeigt damit eine Verschiebung ihres Absorptionsmaximums gegenüber der wässerigen Lösung von ca. 100 Å. Die Konzentration der Lösung errechnet sich zu ungefähr 3,5 % der Farbstoffmenge (ohne Salzgehalt).

Die durch Adsorption mit Watte erhaltene gelbe Lösung, deren Hauptbestandteil die lipophile Komponente ausmacht, hat ihr Absorptionsmaximum bei 4750 Å (Fig. 4, Kurve P_1). Die Menge der lipophilen

Komponente beträgt ohne Berücksichtigung der Dispersität 2 % der ursprünglichen Konzentration des Farbstoffes.

Auch durch die quantitative photometrische Messung ist eine Konzentrationsbestimmung der hydrophilen und lipophilen Farbstoffkomponente sehr schwierig. Es bleibt immer zu berücksichtigen, daß bereits die Trennung nicht quantitativ erfolgt sein kann. Ferner können die Lösungen der Komponenten Dispersitätsunterschiede aufweisen, die die Messung verfälschen.

Die mittelst Amylalkohol resp. Watte isolierten lipophilen Komponenten des Kongorots besitzen das Absorptionsmaximum nicht bei der gleichen Wellenlänge. Die Versuche bestätigen, daß der Amylalkohol stets eine gewisse Menge hydrophilen Farbstoff aufnimmt.

Es wurden auch verschieden konzentrierte Propylalkohollösungen von Kongorot photometriert. Die Verschiebung des Absorptionsmaximums in den Propylalkoholstufen ist jedoch für die quantitative Auswertung im Stufenphotometer zu gering.

Durch die bisherigen Methoden der Komponententrennung der Farbstoffe konnten keine Lösungen der hydrophilen Komponente erhalten werden, die für die Photometrierung genügend rein gewesen wären. Es wurde daher versucht, den Farbstoff auf Zellophanfolien aufziehen zu lassen und die Farbe der hydrophilen Komponente auf diese Art zu messen.

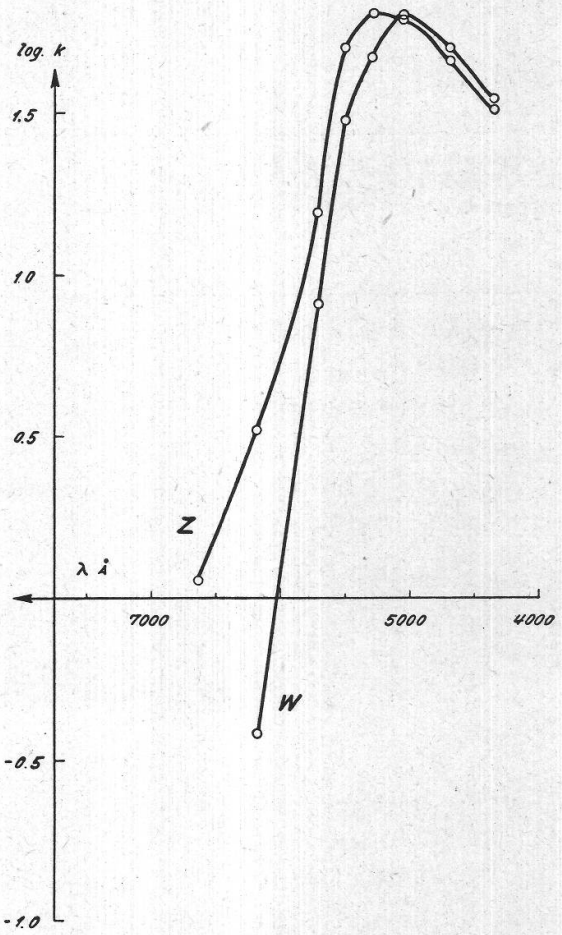
Hiezu wurden Streifen von benetzbarem Zellophan verwendet. Die Färbung erfolgte in wässeriger Lösung (Färbedauer für Kongorot: 10 Min. bis zwei Tage). Der ihnen anhaftende lipophile Farbstoff wurde mit wenig Äthylalkohol ausgewaschen, mit Wasser gespült und die Streifen getrocknet.

Um die Absorptionskurven mit dem Pulfrich-Stufenphotometer messen zu können, wurden die Streifen in Wasser gelegt und zwischen Glasplättchen in die Meßküvetten gestellt. Zum Ausgleich wurden in der Kompensationsküvette ebenso viele Glasplättchen in Wasser durchstrahlt.

Zwischen der wässerigen Lösung und den Zellophanstreifen ist ein Farbunterschied deutlich sichtbar. Entsprechend findet man auch das Absorptionsmaximum gegenüber der wässerigen Lösung um 150 Å nach größern Wellenlängen verschoben bei 5150 Å. Es scheint, daß damit die wahre maximale Absorption der hydrophilen Komponente bestimmt werden konnte (Fig. 4, Kurve Z).

Zwischen den Absorptionsmaxima der lipophilen und hydrophilen Komponente von Kongorot besteht somit eine Differenz von zirka 400 Å. Damit ist die grundsätzliche Verschiedenheit der beiden Komponenten bewiesen.

Die mit Kongorot « Ruggli » gefärbten Zellophanstreifen (Fig. 5, Z) haben ihr Absorptionsmaximum bei 5200 Å, was eine Verschiebung des Maximums von der wässerigen Lösung desselben Farbstoffes (Fig. 5, Kurve W) um 200 Å ergibt.



Figur 5.
Typische Farbkurven von Kongorot «Ruggli». W wässerige Lösung, Z Zellophanstreifen.

c) Typische Farbkurven von Benzoazurin standardisiert und seinen Komponenten.

Die Ergebnisse der Absorptionsmessungen an Benzoazurinlösungen sind in Figur 6 wiedergegeben. Allerdings sind die Werte, die im langwelligen Lichte bestimmt wurden, nur von qualitativer Bedeutung. Immerhin zeigen sie, daß die Kurve (W_1) steil ansteigt, bis sie das Maximum bei 5750 Å erreicht. Im weitern Verlauf fällt die Kurve weniger steil wieder ab.

Da von Benzoazurin standardisiert eine kleine Menge gereinigten Farbstoffs zur Verfügung stand, konnte ähnlich wie beim Kongorot der mengenmäßige Anteil des Farbstoffs im käuflichen Farbpulver bestimmt werden. Aus den Werten $k_1 : k_2$ aus Tabelle 14 ergibt sich diese Farbstoffmenge zu ca. 22 % ($\frac{k_1}{k_2} \cdot 100$, in der Nähe des Absorptionsmaximums gemessen). Früher (vgl. S. 21) wurde ein Anteil von 40 % gefunden. Die mangelnde Übereinstimmung der beiden Bestimmungen ist vermutlich auf die geringere Aggregation der Teilchen zurückzuführen, so daß bei der Photometrierung eine höhere Konzentration vorgetäuscht wird, als sie gravimetrisch gefunden wurde.

Tabelle 14.

Werte von k und log k für Benzoazurin standardisiert und Benzoazurin standardisiert gereinigt.

Wirksamer Filterschwerpunkt λ in Å	k_1 Benzoazurin käufliches 1 ‰	k_2 Benzoazurin gereinigt 1 ‰	$\frac{k_1}{k_2}$	log k_1 käufliches Benzoazurin	log k_2 Benzoazurin gereinigt	log k_2 — log k_1
7500	0,203	0,552	0,369	— 0,693	— 0,259	+ 0,436
7290	0,441	1,204	0,368	— 0,355	+ 0,081	0,436
6660	3,500	12,22	0,286	+ 0,544	+ 1,088	0,544
6190	8,900	42,8	0,207	0,949	1,632	0,683
5720	14,75	65,0	0,227	1,169	1,813	0,644
5300	11,65	55,2	0,211	1,067	1,741	0,674
4940	5,16	20,0	0,258	0,713	1,302	0,589
4630	2,90	11,38	0,254	0,462	1,053	0,591
4340	2,17	8,80	0,247	0,337	0,945	0,608

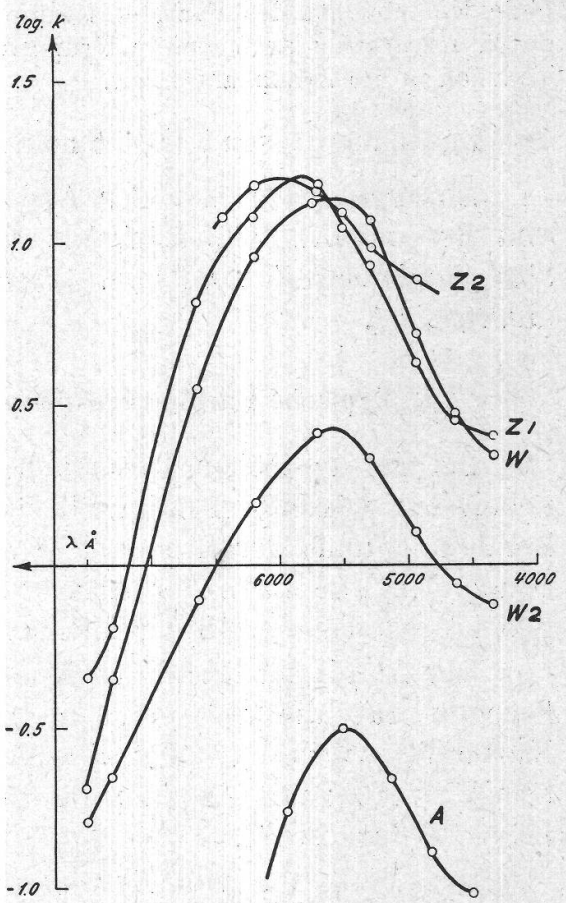
Eine wässerige Lösung von Benzoazurin, die zum Färben von Watte benützt wurde, wies nach dem Färben einen etwas röteren Ton auf als die ursprüngliche Lösung. Es wurde versucht, diese Veränderung, die auf der Entfernung einer gewissen Menge des hydrophilen Farbstoffanteils beruht, photometrisch festzuhalten. Hierzu wurden 100 cm³ wässerige Benzoazurinlösung von 1 ‰ mit zwei Gramm Watte einige Tage stehengelassen. Die übrigbleibende Flotte besitzt ein Absorptionsmaximum bei 5700 Å (Fig. 6, Kurve W_2). Dasselbe ist also um etwa 50 Å gegenüber der normalen wässerigen Lösung verschoben.

In Analogie zu den Versuchen mit Kongorot (vgl. S. 54) wurden auch Benzoazurinlösungen in verschieden konzentrierten Propylalkohollösungen photometriert. Die Verschiebung des Absorptionsmaximums in den Propylalkoholstufen war auch bei diesem Farbstoff für die quantitative Auswertung zu gering.

Die Untersuchung von Lösungen der *reinen Farbstoffkomponenten*, wie sie nach früher beschriebenen Verfahren gewonnen werden können, führte zu folgenden Ergebnissen :

Der *lipophile Anteil* von Benzoazurin standardisiert (Darstellung durch Ausschütteln mit Amylalkohol) zeigt bei 5300 Å das Absorptionsmaximum (Fig. 6, Kurve A). Auch eingedampfte Lösungen von Amylalkohol ergeben das nämliche Resultat. Der Gipfelpunkt der Absorptionskurve ist somit im Vergleich zur wässerigen Lösung um ca. 450 Å nach kürzeren Wellenlängen verschoben.

Die Lösung der lipophilen Komponente in Propylalkohol (Entfernung der hydrophilen Teilchen durch Watte) zeigt die gleichen op-



Figur 6.
Typische Farbkurven von Benzoazurin standardisiert. W_1 wässerige Lösung, W_2 wässerige Restlösung nach der Färbung (vgl. Text), Z_1 Zellophanstreifen gewöhnliche Färbung, Z_2 Zellophanstreifen mit rein blauer Lösung gefärbt (vgl. Text), A Amylalkoholauszug.

tischen Eigenschaften wie der Amylalkoholauszug. Die Berechnung der Farbstoffkonzentration ergibt, daß die lipophile Komponente ca. 5 % des gesamten *reinen* Farbstoffpulvers ausmacht.

Im Gegensatz zu den Beobachtungen an Kongorot erweisen sich die Amyl- und Propylalkohollösungen der lipophilen Komponente von Benzoazurin ungefähr gleich rein. Amylalkohol trennt also Benzoazurin selektiver in seine beiden Anteile als Kongorot.

Die *hydrophile* Benzoazurinkomponente, die auf Zellophanstreifen aufzieht, besitzt ihr Absorptionsmaximum bei 5850 Å. Dieses ist also gegenüber dem der wässerigen Komponente um 100 Å verschoben (Fig. 6, Kurve Z_1).

Mit dem nach Adsorption an Kohle gewonnenen hydrophilen Anteil des Benzoazurins (vgl. S. 49) wurden ebenfalls Zellophanfolien gefärbt. Sie zeichneten sich durch ihre sehr reine blaue Farbe aus. Die photometrische Messung zeigte dann auch, daß das Absorptionsmaximum um weitere 50 Å auf 5900 Å verschoben ist (Fig. 6, Kurve Z_2). Seine Lage ist demnach gegenüber der wässerigen Lösung um 150 Å nach größern Wellenlängen verschoben.

Die beschriebenen Beobachtungen zeigen, daß die Zellophanstreifen, die mit gewöhnlichen wäßrigen Lösungen gefärbt wurden, nicht ausschließlich die hydro-

phile Komponente des Farbstoffs aufgenommen haben. Wahrscheinlich gelangen durch Adsorption an lipophile Gruppen der hydrophilen Teilchen auch lipophile Teilchen in die Zellophanschicht.

Zusammenfassend findet man also, daß die

Absorptionsmaxima der hydrophilen und lipophilen Komponente von Benzoazurin standardisiert um 600 Å gegeneinander verschoben sind. Beide Anteile sind somit als verschiedene chemische Verbindungen identifiziert.

d) Typische Farbkurven der übrigen untersuchten Farbstoffe.

Bei der optischen Untersuchung der übrigen Farbstoffe wurden neben den wässerigen Originallösungen die hydrophile Komponente auf Zellophan und der lipophile Farbanteil im Amylalkoholauszug aufgenommen. Die Lage der Absorptionsmaxima für die einzelnen Lösungen ist aus Tabelle 12 ersichtlich.

Der Anteil der lipophilen Komponente in *Azoblau* (Fig. 7, Kurve A) bezogen auf die wässerige Lösung des Originalfarbpulvers (Fig. 7, Kurve W) wurde zu 3,3 % bestimmt (Benzoazurin : 2 %). Die Absorptionskurve der mit Azoblau gefärbten Zellophanstreifen ist in Figur 7. Kurve Z dargestellt.

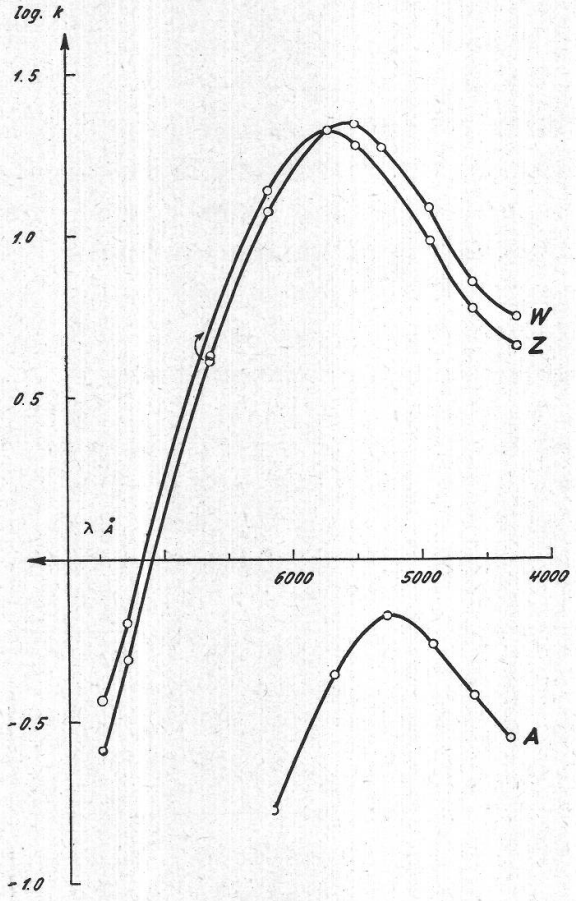
Das Verhalten von *Benzopurpurin* ähnelt weitgehend demjenigen von Kongorot. Die Absorptionsmaxima der wässerigen Farbstofflösung (Fig. 8, Kurve W) und der Zellophanstreifen liegen auch hier ungefähr 200 Å auseinander.

Wir finden also, daß auch die « metachromatischen » Farbstoffe Azoblau und Benzopurpurin als Gemische zweier definierter chemischer Verbindungen aufzufassen sind.

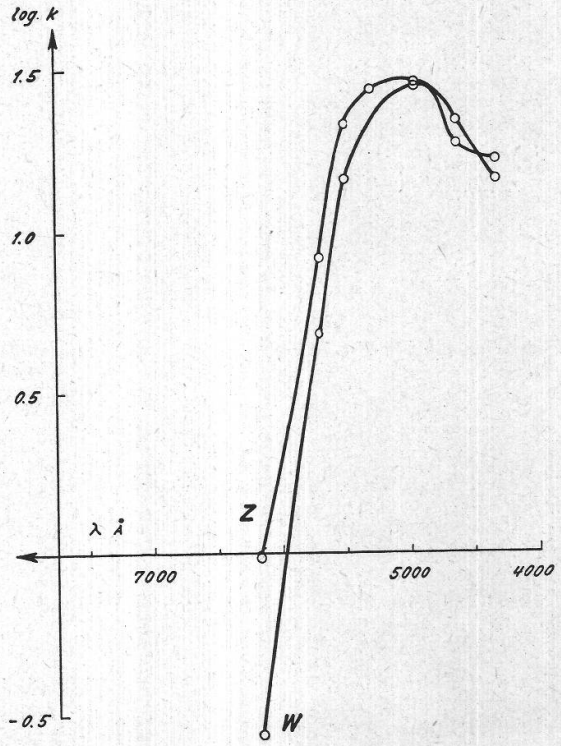
Im Anschluß an unsere Versuche sei eine Arbeit von Krüger (1939) erwähnt, worin festgestellt wird, daß gereinigte Farbstoffe auf « Zellglas » einen etwas andern Ton hervorrufen, als aus der Farbe der wäßrigen Lösung geschlossen worden war. Auf Grund unserer Messungen ist anzunehmen, daß die von Krüger verwendeten Farbstoffe trotz der vorgenommenen Reinigung noch Gemische verschiedener Komponenten geblieben waren.

e) Quantitative Bestimmung der adsorbierten Farbstoffmengen.

Es ist färberisch von besonderem Interesse, die adsorbierte Farbstoffmenge, die ein Färbegut aufgenommen hat, zu kennen. Aus dem Absorptionsmaximum der gefärbten Zellophanfolien kann die eingetretene Farbstoffanreicherung auf diesem Material annähernd bestimmt werden. Dabei muß allerdings berücksichtigt werden, daß durch Dis-



Figur 7.
Typische Farbkurven von Azoblau. W wässerige Lösung, A Amylalkoholauszug, Z Zellophanstreifen.



Figur 8.
Typische Farbkurven von Benzoazurin 4B. W wässerige Lösung, Z Zellophanstreifen.

persitätsänderungen das Beer-Lambertsche Gesetz möglicherweise nicht mehr stimmt. Immerhin können dadurch keine grundsätzlichen Fehler auftreten, wie spätere Versuche zeigen werden.

Zur Berechnung der Farbstoffkonzentration der Zellophanplättchen muß deren Dicke genau bekannt sein. Sie wurde mit einem Deckglastastermikrometer an Hand von sechs Messungen auf einer Fläche von ca. drei Quadratzentimetern festgestellt. Die aufgenommene Farbstoffmenge verglichen wir mit einer einprozentigen wässerigen Lösung des Originalfarbstoffes. Die relativen Anreicherungen, die sich in den gefärbten Folien vollzogen haben, sind in Tabelle 15 zusammengestellt. Je nach Färbedauer und Konzentration der Flotte erhält man recht unterschiedliche Werte.

Tabelle 15.

Relative Farbstoffanreicherung bei der Färbung von Zellophanfolien mit verschiedenen Farbstoffen bei unterschiedlichem Salzgehalt und variabler Färbedauer.

Farbstoff	Konzentration der Flotte 1 ‰ Farbstoff ± Salzzugabe	Färbedauer	Relative Farbstoffanreicherung (durchschnittlicher Wert) gegenüber einer Lösung von 1 ‰
Benzoazurin		5 Tage	17,1
		30 »	27,6
	+ 1% NaCl	5 »	30,5
	+ 1% NaCl	30 »	ca. 70
Azoblau		5 »	13
		30 »	12
Kongorot « Ruggli » . .		1 Std.	3,4
		12 »	5,7
		5 Tage	9
		30 »	17
Gewöhnliches Kongorot .		½ Std.	2,0
		12 »	8,95
		5 Tage	16
	+ 1% NaCl	5 »	19,5
	+ 1% NaCl	30 »	38
		30 »	47[1]
Benzopurpurin 4 B . .		1 Std.	3,1
		12 »	12,2
		5 Tage	20
		30 »	38

[1] Bei dieser Färbung wurde ein anderes Muster Zellophan verwendet.

Die Verlängerung der Färbedauer führt, wie zu erwarten ist, zu vermehrter Farbstoffanreicherung. Die Farbaufnahme folgt aber einer Sättigungskurve. Bei Azoblau ist die maximale Färbung offenbar schon in fünf Tagen erreicht.

Salzzugabe fördert die Farbstoffaufnahme. Das salzfreie Kongorot färbt weniger gut an als das salzhaltige käufliche Produkt. Weitere NaCl-Zugabe zum Originalfarbpulver fördert die Farbstoffaufnahme weiter.

Nicht jedes Zellophan besitzt dieselben färberischen Eigenschaften. Dies zeigten die Versuche mit einem andern Zellophanmuster, das erheblich mehr Farbstoff aufgenommen hat (Tabelle 15).

Die Farbstoffanreicherung in einem Färbegut kann auch noch auf folgende Weise bestimmt werden:

Man gibt zu einer abgemessenen Flotte bekannter Konzentration eine bestimmte Menge des Adsorptionsmittels. Nach Ablauf der Färbezeit läßt sich aus der Konzentrationsdifferenz der Farblösung zu Beginn und am Schluß des Versuches die Farbstoffmenge bestimmen, welche durch das Färbegut aufgenommen worden ist. Auf diese Weise konnte errechnet werden, daß zum Beispiel das Benzoazurin in Baumwolle die 8,4fache Konzentration gegenüber der ursprünglichen Flotte erreicht.

Die auf eine Zellophanfolie aufgezogene Farbstoffmenge braucht nach der Messung durch direkte Photometrierung der gefärbten Folie, resp. durch Bestimmung des Konzentrationsverlustes der Färbeflotte nicht als identisch gefunden zu werden. Die Differenz, welche sich aus den beiden Bestimmungsmethoden ergibt, würde vielleicht Aufschluß über den Dispersitätszustand der Farbstoffteilchen auf der Folie geben.

E. Optische Untersuchung von Dispersitätsreihen.

Schon früher wurde darauf hingewiesen, daß alle bisherigen Arbeiten die Dispersitätsdifferenzen der Farbstoffteilchen in den Farbflotten für die metachromatischen Eigenschaften der Lösungen verantwortlich machen. Unsere sämtlichen Beobachtungen zeigten die Haltlosigkeit dieser einfachen Metachromasietheorie. Auf Grund der ausgearbeiteten Methoden soll aber noch ein direkter Beweis dafür geliefert werden, daß Dispersitätsverschiedenheiten keine qualitative Veränderung der Lichtabsorption substantiver Farbstoffe zu erzeugen vermögen.

Nach allen bisherigen Erfahrungen ist die Dispersität eines Farbstoffes in einem Lösungsmittel unter anderm von seiner Konzentration abhängig. Als Beispiel für unsere Beweisführung dienten deshalb Lösungen von verschiedenen Mengen von Kongorot in Wasser. Bei der Aus-

wahl der Konzentrationsstufen mußte allerdings darauf Bedacht genommen werden, daß das Beer-Lambertsche Gesetz noch für die Lösungen gültig bleibt.

Das Absorptionsmaximum sämtlicher Lösungen liegt bei 5000 Å, wie dies schon früher für wässerige Kongorotlösungen gefunden wurde. Dagegen fallen die Werte für log k (Tabelle 16) in allen Wellenlängen um so größer aus, je verdünnter die Lösung ist. Dies beweist, daß in diesen Flotten eine relativ größere Farbstoffkonzentration bestimmt wurde als in den konzentrierten Lösungen. Die Versuche ergeben also, daß

das Absorptionsmaximum ein und desselben Farbstoffes nicht verschoben wird, dagegen nimmt mit zunehmender Dispersität auch die absolute Größe der Absorption zu.

Damit dürfte endgültig gezeigt worden sein, daß die Dispersität der substantiven Farbstoffe nicht für deren «metachromatische» Eigenschaften verantwortlich ist.

Gleichzeitig bestätigen die Meßwerte erneut, daß das Beer-Lambertsche Gesetz für Lösungskonzentrationen, wie sie in dieser Arbeit verwendet wurden, gültig bleibt. Alle ausgeführten photometrischen Bestimmungen sind deshalb reell und vergleichbar.

Tabelle 16.

Werte von k und log k für verschiedene Konzentrationen von wäßrigen Kongorotlösungen.

Wirksamer Filterschwerpunkt in Å	k_1 0,005 %	k_2 0,01 %	k_3 0,04 %	log k_1	log k_2	log k_3
5300	33,2	33,3	30,8	1,521	1,509	1,489
4940	44,8	43,8	42,7	1,651	1,641	1,631
4630	36,6	32,6	32,1	1,563	1,513	1,507
4340	(19,6)[1]	22,8	21,5	(1,288)[1]	1,350	1,333

[1] Dieser Wert liegt außerhalb der Meßgenauigkeit.

F. Dichroismus der substantiven Färbungen.

Benzoazurin, Kongorot und andere substantive Farbstoffe zeigen den Effekt der Doppelabsorption (Dichroismus), wenn sie an Pflanzenfasern adsorbiert sind. Allgemein entsteht der *Dichroismus* durch gerichtete Anlagerung der Farbstoffteilchen an die innern Oberflächen der Fasern (Ambronn und Frey, 1926). Nachdem nun gefunden wurde, daß eine Reihe substantiver Farbstoffe keine reinen Substanzen, sondern Gemische verschieden gefärbter Verbindungen darstellen, war

es von Interesse, zu prüfen, ob die Komponenten desselben Farbstoffes identische Lichtabsorption im polarisierten Lichte besitzen. Auch bietet der Dichroismus unter Umständen eine weitere Möglichkeit zur Unterscheidung und Identifikation der Farbstoffkomponenten.

In Querschnitten durch das Holz von *Ilex* beobachtet man häufig Zellen, die nach der Färbung mit Benzoazurin eine Schichtung ihrer Membran aufweisen. Die Lamellen nehmen entweder nur den roten oder nur den blauen Farbstoffanteil aus der Lösung auf. Nach den bisherigen Erfahrungen ist die Erscheinung auf verschieden starke Verholzung innerhalb der Zellwand zurückzuführen, so daß eine Trennung in die hydrophile und lipophile Farbstoffkomponente erfolgt. Betrachtet man solche Zellwände im Längsschnitt mit linear polarisiertem Licht, so findet man, daß die blauen Membranlamellen normalen Dichroismus blau-farblos zeigen, während die rotgefärbten Schichten keinerlei Veränderung ihrer Lichtabsorption beim Drehen über dem Polarisator erleiden. Bei den letztern kann man höchstens eine Farbveränderung von einem blauvioletten Ton zur Normalfarbe der reinen lipophilen Komponente beobachten, was dann aber eindeutig zeigt, daß der blaue Farbstoff ebenfalls in die Zellwandschicht eingedrungen ist.

Analoge Beobachtungen sind auch bei verholzten Zellen möglich, die mit Kongorot gefärbt wurden. Normalverholzte Xylemzellen halten sowohl die hydrophile wie auch die lipophile Komponente dieses Farbstoffes fest und weisen daher im gewöhnlichen Lichte die bekannte zinnoberrote Farbe auf. Dreht man nun derart gefärbte Holzzellen über dem Polarisator, so findet man Dichroismus zinnoberrot-gelb. Zieht man mit Kongorot gefärbte Ramiefasern zum Vergleich heran, so beobachtet man im linear polarisierten Lichte den bekannten Farbwechsel karminfarblos.

Bei der echt metachromatischen Chlorzinkjodfärbung liegen gleiche Verhältnisse vor, indem die blau-violette Zellulosereaktion den Dichroismus violettschwarz-farblos zeigt, während die gelbe Lignin-reaktion keinen dichroitischen Effekt aufweist (F r e y 1927).

Aus den Versuchen mit beiden Farbstoffen ist eindeutig abzuleiten, daß die *hydrophile* Farbstoffkomponente einen *scharfen* Dichroismus besitzt, und zwar bei Benzoazurin von Blau nach Farblos, bei Kongorot von Karmin nach Farblos. Im Gegensatz dazu verhalten sich die *lipophilen* Anteile beider Farbstoffe gegenüber linear polarisiertem Licht vollkommen *indifferent*. Es ist deshalb leicht zu verstehen, daß Membranen, die hydrophile und lipophile Farbstoffteilchen festhalten, einen Farbwechsel von der Mischfarbe nach lipophil aufweisen, also ein Verhalten zeigen, wie Xylemzellen, die mit Kongorot gefärbt wurden.

Es kann hier nicht entschieden werden, worin das unterschiedliche optische Verhalten der beiden Farbstoffkomponenten begründet ist. Die

Möglichkeit besteht, daß die lipophilen Farbstoffmoleküle überhaupt keine Doppelabsorption besitzen. Man kann sich auch vorstellen, daß aus räumlichen Gründen keine orientierte Adsorption dieser Farbstoffteilchen stattfindet und sich deshalb ein dem Molekül eigener Dichroismus nicht manifestieren kann. Hierüber würden vielleicht Versuche mit der Strömungsapparatur nach Signer Aufschluß geben (vgl. Frey-Wyßling und Weber 1942). Am wahrscheinlichsten ist es jedoch, daß die ungerichtet eingelagerten Inkrusten den Farbstoff statistisch isotrop aufnehmen (Frey 1927).

Zusammenfassend ergibt sich also, daß bei gewissen substantiven Farbstoffen die lipophile Komponente durch den fehlenden und die hydrophile Komponente durch ihren ausgeprägten Dichroismus sehr scharf voneinander unterschieden werden können.

G. Besprechung der Ergebnisse.

1. Der Zusammenhang zwischen färberischen Eigenschaften und Hydrophilie substantiver Farbstoffe.

Die Fähigkeit einer festen Phase, sich in Wasser bis zu einer molekulardispersen Form aufzuteilen (echte Lösung) ist abhängig von der Zahl (und bei größern Molekülen auch von der Lage) der hydratisierbaren Gruppen. Unsere Versuche haben nun ergeben, daß für die adsorptive Bindung der Moleküle substantiver Farbstoffe deren Hydratisierbarkeit eine ausschlaggebende Rolle spielt. Sämtliche Beobachtungen ergaben übereinstimmend, daß nur die leicht wasserlöslichen Bestandteile der Farbstoffe wirklich substantiv auf die Zellwände aufziehen und daher nicht mehr ausgewaschen werden können. Der für die Hydratation elektrostatisch wirksame Molekülteil liegt dabei immer in den —SO_3H-, —OH-, —NH_2-Gruppen usw., die dementsprechend auch für die Bindung an das Adsorbens verantwortlich sind. Sie gehen offenbar mit Gruppen entgegengesetzter Polarität auf der Membranoberfläche in nebenvalenzmäßige Bindung ein. Fehlen dem Adsorptionsmittel die entsprechenden polaren Gruppen, so tritt keine echte, unauswaschbare Bindung auf. Nur so ist zu erklären, weshalb eine lignifizierte Zellulosemembran die hydrophile Farbstoffkomponente nicht festzuhalten vermag. Die hydrophilen Komponenten von Kongorot und Benzopurpurin folgen allerdings dieser Regel nicht vollständig. Die Versuche zeigten, daß diese Moleküle auch von schwach verholzten Membranen aufgenommen werden. Sie lassen sich auch, im Gegensatz zu den blauen Benzoazurinteilchen mit verdünntem Äthylalkohol aus Zellulose zum Teil wieder ausziehen. Ferner werden sie noch in bedeutend lipophileren Lösungsmitteln dispergiert als Benzoazurin. Wir müssen hieraus schließen, daß sich ihre Moleküle in geringerem Maße hydratisieren, und damit weniger Affinität zu reiner Zellulose, dagegen stärkere Adsorption

Tabelle 17.
Zusammensetzung einiger Farbstoffpulver.

Farbstoff	Trennungs-methode	Bestimmung	Anorganisches Salz	Hydrophile Komponente	Lipophile Komponente
Benzoazurin standardisiert . .	Umkristallisieren	gravimetrisch	60 %	40 %	
—	Umkristallisieren	photometrisch	78 %	22 %	
—	Ultra-Filtration	photometrisch	—	95 %	5 %
—	Adsorption mit Watte	photometrisch	—	95 %	5 %
Kongorot, gewöhnliches . . .	Vergleich mit Kongorot «Ruggli»	photometrisch	69 %	31 %	
—	Amylalkoholauszug	photometrisch	—	97,5 %	3,5 %
—	Adsorption mit Watte	photometrisch	—	92 %	8 %

an Lignin und andern Inkrusten mehr lipophilen Charakters (Kallose) zeigen.

Nun ist auch die von uns als lipophil bezeichnete Farbstoffkomponente in Wasser löslich. Im Gegensatz zum hydrophilen Anteil des Farbpulvers wandern aber diese Teilchen überhaupt nicht in reine Zellulose ein oder werden von ihr nicht festgehalten. Es ist offensichtlich, daß diese Verbindungen gerade noch so stark hydratisierbar sind, daß sie vom Wasser dispergiert werden können, daß ihre Konstitution aber keine Bindung an die Zellulose erlaubt. Die bedeutend bessere Löslichkeit in lipophilen Flüssigkeiten (in abs. Äthylalkohol schwach, in 90 % Propylalkohol noch gut löslich!) gestattet deshalb eine bessere Annäherung an Membranen lipophilen Charakters. Es ist allerdings fraglich, ob diese Farbstoffkomponente auf die ihr chemisch mehr verwandten verholzten Membranen wirklich aufzieht. Anhaltspunkte in dieser Richtung gaben Färbungen von schwach verholzten Leinenfasern, deren Rotfärbung von Benzoazurin in Äthylalkohol nicht mehr restlos entfernt werden konnte. Im allgemeinen läßt sich jedoch die lipophile Farbstoffkomponente aus den von ihr gefärbten Membranen ohne weiteres wieder auswaschen, was nicht auf eine echte substantive Färbung schließen läßt.

Es liegt nahe, die, wenn auch nicht echte Anfärbung verholzter Membranen mit den lipophilen Komponenten substantiver Farbstoffe als Maß für die Stärke der Lignininkrustation heranzuziehen. Griffioen (1938) verwendete zu diesem Zwecke Oxaminblau. Bei einer solchen

färberischen Analyse pflanzlicher Membranen muß jedoch berücksichtigt werden, daß neben Lignin noch andere, ebenfalls hydrophobe Substanzen in den Zellwänden vorkommen. Ferner ergeben unsere Versuche, daß bei stärkerer Verholzung (Xylem, Steinzellen) keine Differenzierung der Farbtöne mehr auftritt, wenigstens bei Färbungen mit Benzoazurin. Kongorot muß nach den obigen Auseinandersetzungen bessere Resultate ergeben, da hier neben der rein lipophilen gelben Komponente auch der hydrophile rote Farbstoffanteil in die Membranen einwandern kann, sofern nicht extreme Verholzung vorliegt. In der Tat können mit Kongorot quantitative Unterschiede in der Lignininkrustation, wie sie zwischen Xylem- und Steinzellen bei *Ilex* vorhanden sind, eindeutig durch unterschiedliche Färbung festgehalten werden.

Die in der vorliegenden Arbeit gefundenen Werte für die Zusammensetzung einiger Farbpulver sind in Tabelle 17 zusammengestellt.

2. Die Metachromasietheorie der substantiven Farbstoffe in neuer Beurteilung.

Alle neuern Erklärungsversuche der Metachromasieerscheinung gehen von der Annahme aus, daß in der Lösung eines substantiven Farbstoffes verschieden große Aggregate derselben Moleküle vorhanden seien, die dank ihres Dispersitätsunterschiedes verschiedene Anfärbungen zu erzeugen vermögen. Die einzelnen Farbtöne, welche ein und dieselbe Lösung erzeugt, wurden einfach als die Phasen eines heterodispersen Systemes betrachtet, die miteinander in einem Gleichgewicht in der Flotte existieren sollten.

Auf dieser Hypothese bauen sowohl Czaja (1930) wie auch Ziegenspeck (1941) ihre Metachromasietheorie auf. Auch Schwarz (1924) und Schulemann (1917) schreiben die verschiedenen Farbtöne, die sich mit einer scheinbar reinen Lösung eines substantiven Farbstoffes erzielen lassen, ausschließlich Dispersitätsunterschieden der gelösten Molekülaggregate zu.

Unsere Versuche haben eindeutig ergeben, daß die Farbe von Assoziationen identischer Moleküle vollständig unabhängig von der absoluten Größe dieser Aggregate ist, daß somit *Dispersitätsänderungen bei substantiven Farbstoffen keine Nuancenänderungen hervorrufen können.* Einen demonstrativen Beweis für diese Behauptung erhält man mit folgendem Versuch: man versetzt eine Lösung von Kongorot mit etwas konzentriertem Ammoniak. Nach einiger Zeit bilden sich *makroskopische* Farbstoffaggregate, die die Lösung undurchsichtig machen und sich allmählich als roter Niederschlag absetzen. Diese Ausfällung hat mit dem von Ziegenspeck (1941) beobachteten *blauen* Niederschlag nichts zu tun, da jene blaue Aggregation nur unter der Ein-

wirkung von Säure entsteht und den bekannten Indikator-Farbumschlag des Kongorotes darstellt.

Es ist auch auf keinerlei Weise möglich, die isolierten verschiedenfarbigen Komponenten aus substantiven Farbstoffen ineinander überzuführen. Auch die harmloseste Methode der Dispersitätsveränderung von Farbstoffaggregaten, nämlich der Zusatz von Neutralsalzen, bringt nicht die geringsten Nuancenverschiebungen zustande. Es ist also ganz klar, daß sich die *Ostwaldsche Farbendispersitätsregel auf die substantiven Farbstoffe nicht anwenden läßt.*

Die verschiedenartige Anfärbung einzelner Gewebselemente mit ein und demselben Farbstoff ist deshalb auf ganz andere Ursachen zurückzuführen, als sie in den bisherigen Metachromasietheorien postuliert wurden. Unsere Trennungsversuche mit Lösungen verschiedener Affinität zu Wasser und die quantitative Bestimmung der Absorptionskurven der Farbstoffkomponenten zwingt zum Schlusse, daß in allen untersuchten Farbstoffen Beimischungen von anderem Chemismus und anderer Farbe vorhanden sind. Die in der Regel verwendeten Farbstoffe sind chemisch keine einheitlichen Substanzen, ihre Färbungen sind deshalb nur scheinbar metachromatisch. Keiner der untersuchten substantiven Farbstoffe besitzt die Eigenschaft der Metachromasie. Fischer (1899) führt diese Erscheinung auf Verunreinigungen der Farbstoffe durch Begleitstoffe zurück. Sie wird von Lehner (1924) als *Allochromasie* bezeichnet. Nach unsern eingehenden Versuchen mit allen möglichen Diazofarbstoffen ist es erwiesen, daß die Erscheinung der Metachromasie, wie sie von Michaelis definiert wird, für die untersuchten Farbstoffe überhaupt nicht existiert.

Als charakteristisches Unterscheidungsmerkmal der beiden Komponenten, die in substantiven Farbstoffen gefunden werden können, beobachteten wir ihre unterschiedliche Hydrophilie. Sie ist die Ursache davon, daß die eine Farbstoffkomponente ausschließlich auf Zellulosemembranen, die andere dagegen nur auf verholzte oder sonstwie lipophil inkrustierte Zellwände aufzieht. Die Art und Weise der Anfärbung einer Membran mit einem bestimmten (« metachromatischen ») Farbstoff läßt daher auf den hydrophilen resp. lipophilen Charakter des Adsorbens schließen, nicht dagegen auf seine Porengröße, wie dies von frühern Autoren immer wieder versucht worden ist.

Die Anwendung von Färbungen der substantiven Farbstoffe zur Messung submikroskopischer Poren und Hohlräume in Zellwänden ist deshalb nach unsern Versuchen unmöglich.

Zusammenfassung.

1. Nach der Definition von Michaelis soll die einheitliche Lösung eines metachromatischen Farbstoffes verschiedene Gewebe in verschiedener Nuance anfärben. Es wurden deshalb mehrere « metachromatische » substantive Farbstoffe auf ihre Einheitlichkeit geprüft.
2. Alle untersuchten Farbpulver (Kongorot, Benzoazurin, Azoblau usw.) lassen sich mittelst Wasser-Amylalkohol-Gemischen in verschiedenfarbige hydrophile und lipophile Komponenten trennen.
3. Die Komponenten desselben Farbstoffes besitzen charakteristische Absorptionskurven und sind deshalb als verschiedene chemische Verbindungen gekennzeichnet.
4. Die Farbdifferenzen der isolierten Komponenten entstehen nicht durch Dispersitätsunterschiede. Dispersitätsänderungen innerhalb der reinen Komponenten führen zu keiner Farbänderung.
5. Die differenzierte Färbung von Geweben mit substantiven Farbstoffen beruht auf der unterschiedlichen Affinität der einzelnen Zellwandtypen zu den Farbstoffkomponenten.
6. Zellulosemembranen färben sich ausschließlich mit der hydrophilen, verholzte und kutinisierte Membranen in erster Linie mit der lipophilen Komponente der substantiven Farbstoffe.
7. Die Größenmessung von submikroskopischen Membranporen mit Hilfe substantiver « metachromatischer » Farbstoffe muß als unmöglich bezeichnet werden; hingegen lassen sich aus den Färbungen Schlüsse auf die Hydrophilie, resp. Lipophilie von Zellwänden ziehen.

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. A. Frey-Wyßling im Pflanzenphysiologischen Institut der Eidgenössischen Technischen Hochschule in Zürich ausgeführt. Es sei mir gestattet, meinem hochverehrten Lehrer für die vielen Anregungen, die er mir hat zuteil werden lassen, den herzlichsten Dank auszusprechen.

Herrn Dr. K. Wuhrmann (Biologisches Laboratorium der Eidgenössischen Material-Prüfungs- und Versuchsanstalt St. Gallen) bin ich für seine Ratschläge ebenfalls sehr zu Dank verpflichtet.

Literaturverzeichnis.

Ambronn und Frey, A. 1926. Das Polarisationsmikroskop. (Leipzig.)

Anderson, D. B. 1927. Über die Struktur der Kollenchymzellwand auf Grund mikrochemischer Untersuchungen. (Sitz. Ber. Akad. Wiss. Wien I. **136,** 429—439.)

Bank, O. und Bungenberg de Jong, H. G. 1939. Untersuchungen über Metachromasie. (Protoplasma **32,** 489—516.)

Bungenberg de Jong, H. G. und Bank, O. 1940. Mechanismen der Farbstoffaufnahme (II). (Protoplasma **34,** 1—21.)

Chodat, R. 1891. Réactif genevois. (Arch. sc. phys. et nat. **25,** 465—467.)

Czaja, A. Th. 1930. Untersuchungen über metachromatische Färbungen von Pflanzengeweben. I. Substantive Farbstoffe. (Planta **11,** 582—626.)

Fischer, A. 1899. Fixierung, Färbung und Bau des Protoplasmas. (Jena.)

Frey, A. 1927. Das Wesen der Chlorzinkjodreaktion und das Problem des Faserdichroismus. (Jb. wiss. Bot. **67,** 597—693.)

— (s. Ambronn und Frey.)

Frey-Wyßling, A. und Weber, E. 1942. Beobachtung von Koagulationserscheinungen in der Strömungsdoppelbrechungstrommel von Signer. (Kolloid-Z. **101,** 199—203.)

Freundlich, H. 1922. Kapillarchemie. (Akad. Verlagsges. Leipzig.)

Griffioen, K. 1938. On the Origin of Lignin in the Cell Wall. (Rec. des travaux bot. néerlandais **35,** 322—414.)

Haller, R. 1921. Das Verhalten von Baumwolle und Wolle zu substantiven Farbstoffen. (Kolloid-Z. **29,** 95—100.)

Heilmeyer, L. 1939. Die Absolutkolorimetrie in Medizin und Biologie. (Zeiß-Nachrichten, **3.** Folge, 163—176.)

Krüger, D. 1939. Die Aufnahme substantiver Farbstoffe durch Zellulose. (Chemiker-Ztg. **63,** 293—295.)

Lehner, J. 1924. Das Mastzellen-Problem und die Metachromasiefrage. (Erg. Anat. Entw. **25,** 67—184.)

Liesegang, R. E. 1927. Kolloidchemische Technologie. (Dresden.)

— 1932. Kolloidchemische Technologie. (Dresden.)

Mark, H. 1930. Faserstruktur und Färbevorgänge. (Melliands Textilber. **11,** 695 bis 698.)

Michaelis, L. 1903. Metachromasie. (Enzyklopädie der mikroskopischen Technik mit besonderer Berücksichtigung der Färbelehre. Ehrlich, Berlin, **II,** 797.)

Michaelis, L. und Rona, P. 1919. Weiteres zur Theorie der Adsorption der Elektrolyte: Die Adsorption der organischen Farbstoffe. (Biochem. Z. **97,** 57—84.)

Morton, T. H. 1935. The Dyeing of Cellulose with Directdyestuffs. The Importance of the colloidal Constitution of the Dyesolution and of the fine Structure of the Fibre. (Transactions of the Faraday Soc. **31,** I, 261—276.)

Ohara, K. 1933. Studien über den Feinbau der Seide. (Scient. Pap. Inst. Physic. Chemic. Research. **21,** 104—127.)

Ostwald, Wo. 1911. Über Farbe und Dispersitätsgrad kolloider Lösungen. (Kolloid-Beih. **2,** 409—487.)

— 1912. Kolloidchemie der Indikatoren I (Kolloid-Z. **10,** 97—107, 132—146.)

— 1924. Licht und Farbe in Kolloiden. (Leipzig.)

Robinson, C. 1935. The Nature of the Solution of Dyes. (Transactions of the Faraday Soc. **31,** I, 245—254.)

Rowe. 1924. Colour Index. (Soc. of Dyers and Colourists.)

Ruge, U. 1937. Über einige Alterungserscheinungen in der Intermicellarsubstanz junger, streckungsfähiger Membranen. (Planta **27,** 436—449.)

Ruggli, P. und Jensen, P. 1935. Die chromatographische Adsorptionsanalyse in Anwendung auf wäßrige Lösungen künstlicher organischer Farbstoffe. (Helv. chim. Acta **18,** 624—643.)

Schirm, E. 1935. Über das Wesen der Substantivität. (J. prakt. Chemie N. F. **144,** 69—92.)

Schneider, H. 1922. Die botanische Mikrotechnik. (Jena.)

Schramek, W. 1940. Die Abhängigkeit der Farbstoffaufnahme regenerierter Zellulosefasern von ihrem Feinbau. (Cellulosechemie **18,** 1—5.)

Schulemann, W. 1917. Theoretische Grundlagen der Vitalfärbung mit sauren Farbstoffen. (Kolloid-Z. **20,** 113—118.)

Schultz, G. 1923. Farbstofftabellen. (Berlin.)

Schwarz, F. 1924. Metachromatische Färbungen pflanzlicher Zellwände durch substantive Farbstoffe. I und II. (Ber. Dt. Bot. Ges. **42,** [21]—[38].)

Steenberg, B. 1941. Ein neues Desorptionsverfahren. (Naturw. **29,** 78.)

Valkó, E. 1937. Kolloidchemische Grundlagen der Textilveredlung. (Berlin.)

Zeiß. Anleitung zum Gebrauch des Pulfrich-Photometers. (Carl Zeiß Jena, Meß 430 d/IV.)

Ziegenspeck, H. 1941. Metachroismus und Dichroismus der Faserfärbungen als eine Folge von Größe und Gestalt der Faser- und Farbstoffteilchen. (Kolloid-Z. **97,** 201—216.)