

Reinigung des Kristallvioletts

Käufliches Kristallviolett wird in viel Wasser gelöst. In die siedende Lösung gibt man so lange in kleinen Portionen 1-n. Natronlauge, bis die Carbinolbase ausflockt. Der Niederschlag wird abgesaugt, mit Wasser gewaschen und getrocknet. Dann wird zweimal aus Ligroin umkri-

stallisiert. Farblose, sich an der Luft schnell violett färbende Kristalle Schmp. 219° C. — Diese Carbinolbase diente zur Herstellung der Kristallviolett-Urlösungen, indem sie in Wasser, das durch ganz geringen Pufferzusatz auf p_{H} 4,5 gebracht worden war, im gewünschten Mengenverhältnis gelöst wurde.

NOTIZEN

Weitere magnetische Untersuchungen zur Struktur der Cyclopentadien- und Inden-Verbindungen der Übergangsmetalle

Von E. O. Fischer u. H. Leipfinger

Anorganisch-chemisches und Physikalisches Institut der Technischen Hochschule München

(Z. Naturforsch. 10 b, 353—355 [1955]; eingeg. am 1. April 1955)

Die Annahme, daß es sich bei den Cyclopentadien- und Inden-Verbindungen der Übergangsmetalle um Durchdringungskomplexe handelt, konnte durch weitere Untersuchung der magnetischen Eigenschaften erhärtet werden.

Die Bindungsverhältnisse der Cyclopentadien- und Inden-Verbindungen mit Übergangselementen lassen sich durch die Annahme von Durchdringungskomplexen erklären, bei welchen die 3 π -Elektronenpaare der aromatisierten (C_5H_5)⁻ bzw. (C_9H_7)⁻-Reste koordinativ in die Schale des zentralen Metallions eintreten¹.

Bei den magnetischen Untersuchungen wurde die scheinbare Gewichtsänderung der Probe im inhomogenen Magnetfeld mit einer empfindlichen Torsionswaage gemessen und daraus die Molsuszeptibilität der Probesubstanz errechnet. Als Eichsubstanz wurde $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ verwendet. Die Messungen wurden in einem Temperaturbereich von 20° K bis 473° K durchgeführt. Ergab sich Paramagnetismus, so wurde von den gemessenen Suszeptibilitäten der aus den tabellierten Ionen- bzw. Atominkrementen berechnete diamagnetische Anteil subtrahiert. Aus dem so erhaltenen rein paramagnetischen Anteil wurde mittels des Curie-Weißschen Gesetzes, das mit Ausnahme von $\text{Mn}(\text{C}_5\text{H}_5)_2$ sehr gut erfüllt wird, das effektive magnetische Moment pro Mol. errechnet.

In den folgenden Tab. 1, 1 a werden die aus der Bindungsvorstellung sich ergebenden effektiven Momente mit den Meßwerten verglichen. In der Spalte (a) sind die vorkommenden Zentralionen aufgeführt, in Spalte (b) deren Elektronenkonfiguration, von der ersten nicht vollbesetzten Schale an. Spalte (c) enthält die Elektronenanordnung des Metalls nach der Komplexbildung und Spalte (d) die somit zu erwartende Zahl ungepaarter Elektronen. Für das magnetische Verhalten der Übergangselemente sind praktisch nur die Spinmomente verantwortlich, da die Bahnmomente durch elektrische Kri-

stallfelder völlig zerstört werden. So ergeben sich die in Spalte (e) aufgeführten Momente pro Molekül in Bohrschen Magnetonen

$$P_{\text{eff}} = \sqrt{4S(S+1)},$$

wenn S die Quantenzahl des Gesamtelektronenspins des Moleküls bedeutet. In Spalte (f) sind die untersuchten Verbindungen angegeben, in Spalte (g) die absoluten Temperaturen, bei denen sie untersucht wurden. Spalte (h) enthält die experimentell bestimmten magnetischen Momente².

Zwischen den erwarteten magnetischen Momenten und den Meßwerten besteht sehr gute Übereinstimmung, mit Ausnahme des $\text{Ni}(\text{C}_9\text{H}_7)_2$. Doch wurde hier die gleiche Magnetonzahl auch bei Anwendung der Parawasserstoffmethode gefunden³. Wie die Tab. 1 ferner zeigt, wurde für alle Verbindungen, die nach der eingangs kurz erwähnten Bindungsvorstellung Krypton-, Xenon- bzw. Radonkonfiguration für das zentrale Metall ergeben, Diamagnetismus gefunden.

Außer den Verbindungen mit Übergangselementen wurden auch solche mit Magnesium als Zentralion untersucht (Tab. 1 a):

Beide Verbindungen sind als Ionenkomplexe aufzufassen, mit Neonkonfiguration des Magnesiumions.

Besonders interessante Verhältnisse liegen bei $\text{Mn}(\text{C}_5\text{H}_5)_2$ vor⁴. Diese Verbindung wurde bei 20° K, 77° K, 90° K, 202° K, 292° K, 393° K, 418° K, 433° K, 453° K und 473° K magnetisch untersucht. Das Ergebnis ist in der Abb. 1 dargestellt. Das $1/\chi$ -T-Diagramm zeigt einen Sprung in den magnetischen Eigenschaften bei 158° K. Bei dieser Temperatur hat die Substanz einen charakteristischen Umwandlungspunkt; denn die bei tieferen Temperaturen braunen Kristalle nehmen nach dem Überschreiten des Umwandlungspunktes einen hellorange-braunen Farbton an. Dieser Vorgang ist reversibel. Im Gegensatz zu den anderen Cyclopentadien-Verbindungen, die monoklin kristallisieren, haben die braunen $\text{Mn}(\text{C}_5\text{H}_5)_2$ -Kristalle rhombische Struktur.

Es wurden auch isomorphe Mischkristalle von $\text{Mn}(\text{C}_5\text{H}_5)_2$ (53%) und $\text{Mg}(\text{C}_5\text{H}_5)_2$ (47%) bei den gleichen zehn Temperaturen untersucht. Es ergab sich jedoch, daß hier, nach Abzug der bereits bekannten diamagnetischen Suszepti-

² Einige der Werte wurden von W. Lechner gemessen.

³ Nach Messungen von J. Voithländer, Phys. chem. Institut der Universität München.

⁴ Der von F. Engelmann l. c. gemessene Wert ist zu streichen.

¹ E. O. Fischer u. W. Pfab, Z. Naturforsch. 7 b, 377 [1952]; E. Ruch u. E. O. Fischer, Z. Naturforsch. 7 b, 676 [1952]; F. Engelmann, Z. Naturforsch. 8 b, 775 [1953].



a	b	c	d	e	f	g	h
V ⁺²	3d ³	3d ⁷ 4s ² 4p ⁶	3	3,87	V(C ₅ H ₅) ₂	423, 291, 202, 90, 77, 20	3,78 ± 0,19
Cr ⁺²	3d ⁴	3d ⁸ 4s ² 4p ⁶	2	2,83	Cr(C ₅ H ₅) ₂	295, 90	3,02 ± 0,15
Ni ⁺²	3d ⁸	3d ¹⁰ 4s ² 4p ⁶ 4d ²	2	2,83	Ni(C ₅ H ₅) ₂	291, 201, 90, 77, 20	2,86 ± 0,09
V ⁺¹	3d ³ 4s ¹	3d ¹⁰ 4s ² 4p ⁶	0	0	V(C ₅ H ₅) (CO) ₄	293, 202, 90, 20,	0
Cr ⁺³	3d ³	3d ⁷ 4s ² 4p ⁶	3	3,87	{[Cr(C ₅ H ₅) ₂] ·	285, 90	3,83 ± 0,19
Cr ⁰	3d ⁵ 4s ¹	3d ¹⁰ 4s ² 4p ⁶			{[Cr(C ₅ H ₅) (CO) ₃]		
Cr ⁺¹	3d ⁵	3d ¹⁰ 4s ² 4p ⁶	0	0	[Cr(C ₅ H ₅) (CO) ₃] ₂	294, 202, 90	0
Cr ⁺¹	3d ⁵	3d ¹⁰ 4s ² 4p ⁶	0	0	Cr(C ₅ H ₅) (CO) ₃ H	293, 90	0
Cr ⁰	3d ⁵ 4s ¹	3d ¹⁰ 4s ² 4p ⁶	0	0	Cr(C ₅ H ₅) (CO) ₂ NO	294, 90	0
Mn ⁺¹	3d ⁵ 4s ¹	3d ¹⁰ 4s ² 4p ⁶	0	0	Mn(C ₅ H ₅) (CO) ₃	293, 90, 20	0
Fe ⁺¹	3d ⁶ 4s ¹	3d ¹⁰ 4s ² 4p ⁶	0	0	[Fe(C ₅ H ₅) (CO) ₂] ₂	293, 90	0
Co ⁺¹	3d ⁷ 4s ¹	3d ¹⁰ 4s ² 4p ⁶	0	0	Co(C ₅ H ₅) (CO) ₂	296, 90	0
Ni ⁰	3d ⁸ 4s ²	3d ¹⁰ 4s ² 4p ⁶	0	0	Ni(C ₅ H ₅)NO	287, 90	0
Mo ⁺¹	4d ⁵	4s ² 4p ⁶ 4d ¹⁰ 5s ² 5p ⁶	0	0	Mo(C ₅ H ₅) (CO) ₃ H	292, 90	0
W ⁺¹	5d ⁴ 6s ¹	5s ² 5p ⁶ 5d ¹⁰ 6s ² 6p ⁶	0	0	W(C ₅ H ₅) (CO) ₃ H	291, 90	0
Fe ⁺²	3d ⁶	3d ¹⁰ 4s ² 4p ⁶	0	0	Fe(C ₉ H ₇) ₂	296, 90	0
Fe ⁺²	3d ⁶	3d ¹⁰ 4s ² 4p ⁶	0	0	Fe(C ₉ H ₁₁) ₂	293, 90	0
Co ⁺²	3d ⁷	3d ¹⁰ 4s ² 4p ⁶ 4d ¹	1	1,73	Co(C ₉ H ₇) ₂	293, 90	1,76 ± 0,09
Ni ⁺²	3d ⁸	3d ¹⁰ 4s ² 4p ⁶ 4d ² (?)	2	2,83	Ni(C ₉ H ₇) ₂	291, 90	2,12 ± 0,10
Ru ⁺²	4d ⁶	4s ² 4p ⁶ 4d ¹⁰ 5s ² 5p ⁶	0	0	Ru(C ₉ H ₇) ₂	289, 90	0

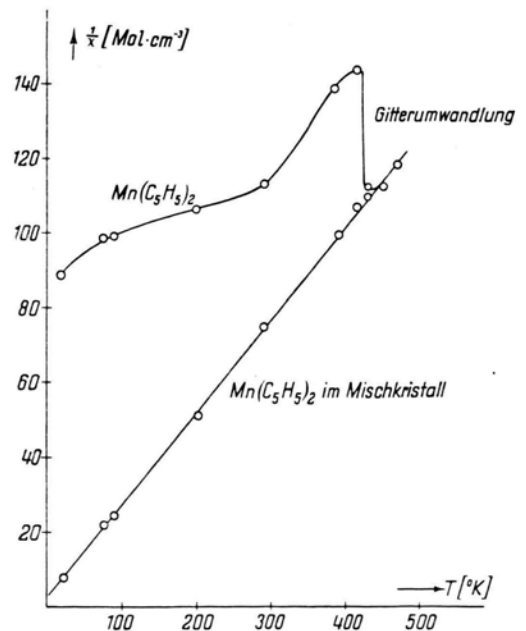
Tab. 1. Magnetisches Verhalten von Komplexen des Cyclopentadiens und Indens mit Übergangsmetallen.

a	c	d	e	f	g	h
Mg ⁺²	2s ² 2p ⁶	0	0	Mg(C ₅ H ₅) ₂	293, 201, 90, 77, 20	0
Mg ⁺²	2s ² 2p ⁶	0	0	Mg(C ₉ H ₇) ₂	294, 90	0

Tab. 1 a. Magnetisches Verhalten von Mg(C₅H₅)₂ und Mg(C₉H₇)₂.

bilität der Magnesiumverbindung, der Mangananteil allein das Gesetz von Curie-Weiß erfüllt (vgl. Abb. 1), mit einem effektiven Moment von $(5,71 \pm 0,29)$ B.M. Dies entspricht fünf ungepaarten Elektronen. Damit ist anzunehmen, daß in diesem Fall Mn(C₅H₅)₂ in Form eines Ionenkomplexes vorliegt. Bemerkenswerterweise kristallisieren die Mischkristalle monoklin.

Wie die Abb. 1 weiter zeigt, laufen oberhalb des Umwandlungspunktes die beiden Kurven zusammen, woraus geschlossen werden kann, daß in diesem Bereich die reine Mn-Verbindung als Ionenkomplex vorliegt. Bezüglich des übrigen Temperaturbereichs läßt sich nur die Vermutung⁵ aussprechen, daß der bei Manganverbindungen öfters auftretende Antiferromagnetismus eine Rolle spielen kann; Genaueres läßt sich darüber zur Zeit noch nicht sagen.

Abb. 1. $\frac{1}{\chi}$ -T-Kurven für Mn(C₅H₅)₂ und Mn(C₅H₅)₂ — Mg(C₅H₅)₂.

Dem Direktor des Tieftemperaturforschungsinstituts der Bayerischen Akademie der Wissenschaften, Herrn Prof. Dr. W. Meißner, sind wir für die Lieferung des benötigten flüssigen Wasserstoffs zu besonderem Dank verbunden, ebenso Herrn Prof. Dr. G. Joos für stete Betreuung.

⁵ Von G. Wilkinson in einer privaten Mitteilung zuerst angegeben. Vgl. auch C. Wilkinson u. F. A. Cotton, Chem. and Ind. **11**, 307 [1954]; G. Wilkinson u. J. M. Birmingham, J. Amer. chem. Soc. **76**, 6210 [1954].

Cyclopentadienyl-kobalt-dicarbonyl

Von E. O. Fischer und R. Jira

Anorganisch-chemisches Laboratorium
der Technischen Hochschule München

(Z. Naturforschg. **10 b**, 355 [1955]; eingeg. am 14. April 1955)

Es wird über Darstellung und Eigenschaften eines flüssigen, rotbraunen, diamagnetischen Cyclopentadienyl-kobalt-dicarbonyls $(C_5H_5)Co(CO)_2$ berichtet.

In weiterer Bestätigung unserer vor kurzem erstmals dargelegten Ansicht¹ über das Aufbauprinzip der Cyclopentadienyl-metall-carbonyle, wonach Übergangsmetalle ungerader Ordnungszahl solche monomeren Charakters, gerade hingegen dimere Typen ergeben, kann nach der Darstellung des orangen $(C_5H_5)V(CO)_4$ ² Schmp. 138°, des gelben, völlig luftbeständigen $(C_5H_5)Mn(CO)_3$ ³ Schmp. 77° nun auch über ein bereits vor einiger Zeit erstmals erhaltenes flüssiges Cyclopentadienyl-kobalt-dicarbonyl $(C_5H_5)Co(CO)_2$ ³ kurz berichtet werden.

Wir erhielten es bei der Umsetzung von $Co(C_5H_5)_2$ ⁴ mit CO bei Reaktionstemperaturen von 90–150° und 200 Atm. Druck als rotbraune, leicht flüchtige Flüssigkeit, welche sich nur sehr schwer von organischen, gleichzeitig in Nebenreaktionen entstandenen Verunreinigungen trennen ließ. Bereits beim Erwärmen wenig über Zimmertemperatur zeigen sich bei der Hochvakuumdestillation Zersetzungserscheinungen. Die Verbindung neigt zur CO-Abspaltung, welche auch die Analyse erschwert.

$(C_5H_5)Co(CO)_2$	Ber. Co 32,73	C 46,69	H 2,80
	Gef. Co 33,67	C 45,54	H 2,75

Das an Luft zersetzliche Produkt ist löslich in organischen Medien wie Benzol oder Äther und bei Sauerstoff-Ausschluß darin beständig. In Wasser tritt weder Lösung noch rasche Hydrolyse ein. Mit Jod-Pyridin erfolgt Zersetzung unter CO-Abspaltung. Der Schmp. liegt nach vorläufigen Messungen bei –22°, der von teilweiser Zersetzung begleitete Sdp. (710 mm Hg) bei 139°–140°. Das Mol.-Gew. wurde in O₂-freiem Benzol nach der kryoskopischen Methode zu 176 (ber. 180) gefunden, so daß die monomere Formel bewiesen ist.

¹ E. O. Fischer u. W. Hafner, Z. Naturforschg., im Erscheinen.

² E. O. Fischer u. W. Hafner, *ibid.* **9 b**, 500 [1954].

³ E. O. Fischer u. R. Jira, *ibid.* **9 b**, 618 [1954].

⁴ a) E. O. Fischer u. R. Jira, *ibid.* **8 b**, 327 [1953]. b) G. Wilkinson, P. L. Pauson u. F. A. Cotton, J. Amer. chem. Soc. **76**, 1970 [1954].

$(C_5H_5)Co(CO)_2$ ist entsprechend einer Molsuszeptibilität von $\chi_{Mol}^{291^\circ K} = -76 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^3/\text{Mol}$ diamagnetisch wie alle anderen Cyclopentadienyl-metall-carbonyle. Wir fassen die Verbindung als krypton-konfigurierten Durchdringungskomplex auf, in welchem die gesamten π -Elektronen des Fünfrings wie auch die einsamen Elektronenpaare der zwei CO-Moleküle in die Elektronenhülle des Metalls mit einbezogen sind. Im Falle der von anderer Seite für die Cyclopentadienyl-Verbindungen mit Übergangsmetallen angenommen Einfachbindung⁵ würden wir unter den absichtlich scharf gewählten Druckbedingungen der Darstellung die Entstehung eines $(C_5H_5)Co(CO)_4$ erwarten. Die sterische Möglichkeit für ein solches zeigt die Existenz von $(C_5H_5)V(CO)_4$.

Für die Durchführung der magnetischen Messung sind wir Herrn cand. phys. H. Leipfinger zu besonderem Dank verpflichtet.

⁵ a) J. D. Dunitz u. L. E. Orgel, Nature **171**, 121 [1953]. b) W. Moffit, J. Amer. chem. Soc. **76**, 3386 [1954]. c) F. A. Cotton u. G. Wilkinson, Z. Naturforschg. **9 b**, 453 [1954].

Fluoreszenz und Fluoreszenzpolarisation myelotroper Nervenfasern nach Fluorochromierung in der Umgebung des IEP des Fluoresceins

Von Joachim-Hermann Scharf

Anatomisches Institut der Johannes-Gutenberg-Universität
Mainz

(Z. Naturforschg. **10 b**, 355–356 [1955]; eingeg. am 4. Mai 1955)

Während in der physikalisch-chemischen Literatur die Umladbarkeit des Fluoresceins bei $p_H \sim 3$ entweder eindeutig bekannt ist (Förster¹), oder zwar die damit verbundenen Phänomene des Wiederauftretens einer stärkeren Fluoreszenz beobachtet, aber falsch gedeutet wurden (Batscha²), kennen andere Autoren nur das Absinken von Absorption und Fluoreszenzhelligkeit bzw. das Auftreten eines Niederschlages im p_H -Bereich der freien Säure dieses Farbstoffes (Bandow³, Bouchard⁴, Boutaric und Roy⁵, Holmes⁶, Schultz⁷). In der biologischen Literatur ließen sich keinerlei Angaben über den IEP oder ein elektropositives Protomer des Fluoresceins finden. Im Gegenteil, Strugger⁸ betont ausdrücklich, daß dieser Farbstoff nicht umladbar sei und bei jedem p_H anodisch wandere. Außerdem soll der Farbstoff völlig lipoid-unlöslich sein und ausschließlich elektro-

¹ Th. Förster, Fluoreszenz organischer Verbindungen. Göttingen 1951.

² B. Batscha, Ber. dtsch. chem. Ges. **59**, 311 [1926].

³ F. Bandow, Lumineszenz. Ergebnisse und Anwendung in Physik, Chemie u. Biologie. Stuttgart 1950.

⁴ J. Bouchard, J. Chim. physique **33**, 51 [1936].

⁵ A. Boutaric et M. Roy, C. R. hebd. Séances Acad. Sci. **209**, 162 [1939].

⁶ W. C. Holmes, J. Amer. chem. Soc. **46**, 27 [1924].

⁷ G. Schultz, Farbstofftabellen. 7. Auflage. Leipzig 1931.

⁸ S. Strugger, Flora [Jena] **132**, 253 [1937/38]

p_H	Bindegewebsfasern		Nervenfasern		Bemerkung
	kollagene	elastische	Markscheide	Achsenzylinder	
2,18	dunkelgrün	gelblich	dunkelgelbgrün	dunkelgelbgrün	allgemeine schwache Fluoreszenz Nerven heller als kollagene Fasern
3,7	sehr schwach dunkelgrün	hellgrün	hell gelbgrün	hell gelbgrün, wenig schwächer als Markscheide	
4,85	sehr stark hellgrün	hell gelbgrün	dunkelgrün	dunkelgrün	kollagene Fasern heller als Nerven

Tab. 1. Der Effekt zeigt deutlich, daß im Achsenzylinder myelotroper („markhaltiger“) Nervenfasern beachtenswerte Lipoidmengen vorkommen, die mit morphologischen Mitteln nachweisbar sind.

adsorptiv gebunden werden. In seiner Monographie⁹ vertritt der Autor offenbar die gleiche Meinung. Nach Drawert¹⁰ soll Fluorescein R (= Schultz Nr. 880) bei p_H 2,0 nicht eindeutig, ab p_H 3,1 eindeutig zur Anode wandern. Der Farbstoff soll bei keinem p_H in Chloroform ausgeschüttelt werden können. Bei p_H 2,0 bilde er einen Niederschlag, der bei HCl-Zugabe wieder löslich wird.

Eigene Untersuchungen ergaben, daß Fluorescein (sechs verschiedene Präparate) einen deutlichen IEP bei p_H 3,3 bis 3,8 aufweist. Das Neutrale Molekül kann quantitativ in Benzol unter Farb- und Fluoreszenzverlust (Lactonbildung) und *n*-Octanol unter Beibehaltung einer abgeschwächten Fluoreszenz (freie Säure) ausgeschüttelt werden. Bei $p_H < 3,3$ wandert der dunkelgrün fluoreszierende Farbstoff deutlich zur Kathode, er ist nicht bzw. nur schwach „lipoid-löslich“. Bei $p_H > 3,8$ liegt Fluorescein als einwertiges, am Carboxyl dissoziiertes Anion vor, $p_K \sim 5,2$. Maximale zweiwertige Dissoziation ist erreicht bei p_H 8,6, was mit den Angaben^{5,6} übereinstimmt. Das elektrische Verhalten des Fluoresceins zeigt große Parallelen zum Rhodamin G (Kölbl¹¹), wenn auch die Ursachen andere sind.

Trockenes Pulver der Farbsalze ist unlöslich in unpolaren nicht-wäßrigen Solventien bis hinauf zu einer *DK* von 6,62 (Methylbenzoat), Farbsäurepulver dagegen löst sich etwas in Estern, Spuren in Kohlenwasserstoffen. In Solventien höherer *DK* lösen sich Pulver von Säure und Salzen. Zur Bestimmung der Reinheit wurden die Farbstoffe chromatographiert: Adsorptions-Säulenchromatographie mit neutralem Al_2O_3 und Aceton als Solvens ergab übereinstimmend mit Papierelektrophorese nach Turba und Ennenkel¹² bei drei Präparaten zwei Fraktionen (und Verunreinigungen), die sich in ihrem Verhalten im elektrischen Feld gleichartig verhalten, lediglich der IEP ist um wenige Zehntel einer p_H -Stufe unterschiedlich. Beide sind ähnlich gefärbt und fluoreszieren ähnlich. Drei Präparate waren chromatographisch fast rein.

Anwendung an Gefrierschnitten durch Nerven ergab interessante Befunde, von denen hier auszugsweise einige mitgeteilt werden sollen. Die Färbung erfolgte in p_H -ab-

gestuften Farbbädern ($\frac{n}{15}$ -Phosphatpuffer, die sauren mit Zusatz von $\frac{n}{10}$ -HCl) mit einer Konzentration von 0,1^{0/00} Fluorescein-Kalium. Nach der Färbung, die diachromatisch nur einen sehr schwachen Kontrast bildet, wurden die Schnitte in farb-freiem Puffer gleicher c_H ausgewaschen.

Während bei Erregung mit linear polarisiertem UV- oder Blaulicht das Fluoreszenzlicht der kollagenen Fasern kaum oder nicht polarisiert ist, zeigt die Emission der Nervenfasern deutliche Polarisation. Das Vorzeichen für die Markscheide ist in bezug auf die Länge eindeutig negativ, auf den Querschnitt positiv, der Gangunterschied ist relativ hoch. Für den Achsenzylinder konnte das Vorzeichen nicht immer eindeutig bestimmt werden, meist war es bei dicken Fasern positiv in bezug auf die Länge.

Die polarisierte Fluoreszenz der Nervenfasern kann ebenfalls nur als Folge der Lösung des Farbstoffes in einer kristallinen Flüssigkeit (Zocher¹³) gedeutet werden. Da reines Lecithin bei Quellung sich gleichartig verhält, dürfte Solvatkomplexbildung zwischen Lecithin- und Farbstoffmolekülen vorliegen.

Die Halogenabkömmlinge des Fluoresceins sind nicht umladbar, sie zeigen aber bei Markscheiden-Fluorochromierung deutlich Farbvertiefung (Äthylester des Tetrachlortetrabromfluoresceins: Kollagene Fasern dunkelgrün, Markscheiden hell goldgelb). Die Fluoreszenz ist ebenfalls polarisiert.

Ausführliche Darstellung erfolgt in größerem Rahmen in der „Mikroskopie (Wien)“. Durchgeführt mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

¹³ H. Zocher, Trans. Faraday Soc. 35, 34 [1939].

Exogastrula-Keime bei *Bithynia tentaculata*

Von Oswald Heß

Zoologisches Institut der Techn. Hochschule Darmstadt
(Z. Naturforschg. 10 b, 356—357 [1955]; eingeg. am 2. Mai 1955)

Raven¹ entdeckte, daß bei *Limnea stagnalis* die Gastrulation durch Behandlung mit Lithiumchlorid verhindert werden kann. Auch die Keime von *Bithynia tentaculata* exogastrulieren nach einer solchen Behandlung.

Die Exogastrulae des Süßwasser-Prosobranchiers konnten ohne Schwierigkeit 4 Wochen und länger am Leben erhalten werden. Bis zum Alter von etwa einer Woche

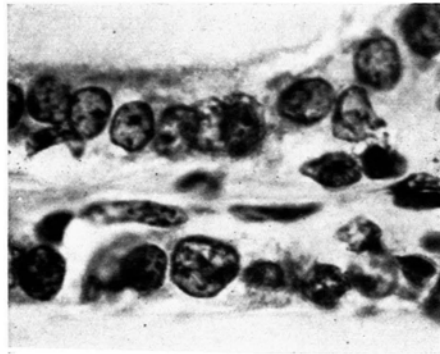
¹ Chr. P. Raven, J. exp. Zoology 121, 1 [1952].

⁹ S. Strugger, Fluoreszenzmikroskopie und Mikrobiologie. Hannover 1949.

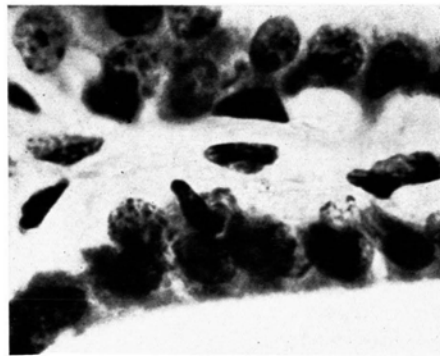
¹⁰ H. Drawert, Flora [Jena] 135, 21 [1941].

¹¹ H. Kölbl, Z. Naturforschg. 3 b, 442 [1948].

¹² F. Turba u. H. J. Ennenkel, Naturwissenschaften, 93 [1950].



a



b

Abb. 1. Schnitte durch die Follikelzellen einer Rattenschilddrüse, a) nach 20-stdg. Fixation in Carnoyscher Lösung, b) nach vorausgegangener Gefriertrocknung. Färbung mit Toluidinblau.

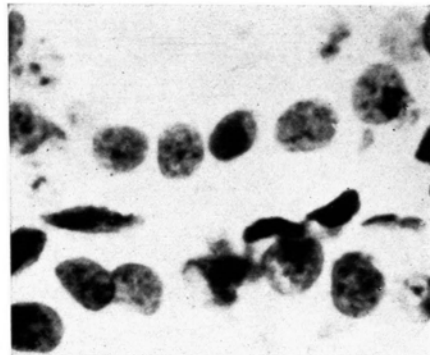


Abb. 2. Der gleiche Gewebsschnitt wie in Abb. 1 b nach 6-stdg. Einwirkung von Ribonuclease (10 mg/100 ml) und anschließender Färbung mit Toluidinblau. Die Basophilie des Cytoplasmas ist verschwunden.

entwickeln sie sich ähnlich wie die *Limnea*-Keime. Auf dem nicht invaginierten Entoderm der Exogastrula sitzt animalwärts eine meist sehr große Ectodermblase. Im Alter von 6–7 Tagen beginnt eine Entodermvergrößerung, die zur Bildung der Leberlappen führt. Dabei stülpt sich das Entoderm ungefähr an der ventralen Berührungsstelle zwischen Ento- und Ectoderm ins Innere der Ectodermblase ein (s. Abb. 1). Im Gegensatz zu *Limnea* gerät bei *Bithynia* dadurch das Entoderm zum größten Teil doch noch unter das Ectoderm. An der Stelle der Berührung des eingestülpten Entoderms mit dem Ectoderm entsteht eine Schalendrüse, die in vielen Fällen ein

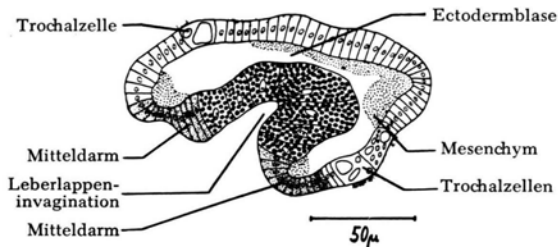


Abb. 1. 7 Tage alte Exogastrula; Beginn der Leberlappen-Bildung, histologische Differenzierung des Entoderms in Leber- und Mitteldarmgewebe. Schematische Zeichnung nach Mikrophoto.

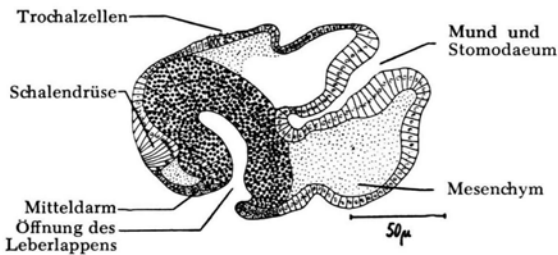


Abb. 2. 13 Tage alte Exogastrula; Entstehung der Schalendrüse an der Berührungsstelle zwischen Ecto- und Entoderm im Innern der Ectodermblase, Stomodaeum-Bildung durch das ventrale Ectoderm, Mitteldarmgewebe um die noch bestehende Leberlappen-Öffnung. Schematische Zeichnung nach 4 aufeinander folgenden Sagittalschnitten.

Konchiolinhäutchen abscheidet. Diese Befunde stützen die von Raven erstmals für *Limnea* aufgestellte Theorie, daß die Schalendrüse vom Ectoderm im Entoderm induziert wird. Da in der Normogenese die Schalendrüse bereits im Alter von 3 Tagen entsteht, während bei den Exogastrulae frühestens nach 6 Tagen die Leberlappen-Bildung einsetzt, behält das Entoderm offenbar sehr lange die Fähigkeit, den Bildungsreiz für die Schalendrüse abzugeben und das Ectoderm kann auf den verspäteten Reiz hin ebenfalls noch mit Schalendrüsen-Bildung antworten. Gleichzeitig mit der Einstülpung des Leberlappens differenziert sich das übrige Entoderm in Mitteldarm-Gewebe, das sich in der Gegend der Leberlappen-Öffnung befindet. Nach Verschuß der Öffnung bleibt es größtenteils an der Oberfläche des Exogastrula-Keims liegen.

Die Einstülpung des Stomodaeums (s. Abb. 2) erfolgt meist ohne Kontakt mit dem Entoderm im ventralen

Ectoderm. Sie erfolgt auch dann, wenn ausnahmsweise die Leberlappen-Bildung unterbleibt. Diese Beobachtung weist darauf hin, daß dieses Organ durch Selbstdifferenzierung eines ventralen Ectodermbezirkes entsteht. Bei Exogastrulae wurde nie eine Radulatasche gefunden, jedoch tritt die histologische Differenzierung des Stomodaeums in Ösophagus und Pharynx bei älteren Keimen fast immer ein.

Erstaunlicherweise entwickeln sich Halbkeime nach Isolierung der Blastomeren während der beiden ersten Furchungsteilungen ganz ähnlich. Auch bei ihnen stülpt sich ein Leberlappen nach der Exogastrulation ins Innere einer großen Ectodermblase ein, worauf im Ectoderm die Schalendrüse entsteht. Obwohl alle Halbkeime mit Leberlappen-Einstülpung eine Schalendrüse bilden, besitzt nur ein Teil ein Stomodaeum. Auch dies weist darauf hin, daß die Schalendrüse durch Induktion und das Stomodaeum durch Selbstdifferenzierung entsteht.

Eine ausführliche Mitteilung der Ergebnisse wird z. Zt. vorbereitet.

Quantitativ-chemische Untersuchungen zur färberischen Darstellung der Pentosenucleinsäure* in Gewebsschnitten

Von Eberhard Harbers
und Karlheinz Neumann**

Institut für Medizinische Physik und Anatomisches Institut der Universität Göttingen

(Z. Naturforschg. 10 b, 357–359 [1955]; eingeg. am 17. Januar 1955)

Zur histochemischen Darstellung der Pentosenucleinsäure (PNS) werden die Gewebsschnitte meist mit basischen Teerfarbstoffen gefärbt. Da diese Färbung nicht in allen Fällen spezifisch ist, versucht man, in Kontrollschnitten die PNS zu entfernen. Dies gelingt entweder enzymatisch mittels kristalliner Ribonuclease (Brachet¹) oder mit Hilfe anderer Hydrolyseverfahren^{2–10}, die die PNS zer-

* Da heute noch nicht sicher entschieden ist, ob die Nucleinsäuren keine anderen Zucker enthalten als Ribose bzw. Desoxyribose, sind von biochemischer Seite die allgemeineren Bezeichnungen Pentosenucleinsäuren (statt Ribonucleinsäure) und entsprechend Desoxypentosenucleinsäure eingeführt worden.

** Diese Untersuchungen wurden mit Mitteln der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt. Soweit sie die Gefriertrocknung betreffen, wurden sie von der Leybold-Hochvakuum-Anlagenbau G.m.b.H. gefördert.

¹ J. Brachet, *Enzymologia* [Amsterdam] 10, 87 [1941].

² R. O. Erickson, K. B. Sax u. M. Ogur, *Science* [Washington] 110, 472 [1949].

³ H. Koenig, *J. nat. Cancer Inst.* 10, 1346 [1950].

⁴ H. Koenig u. H. Stahlecker, *J. nat. Cancer Inst.* 12, 237 [1951].

⁵ H. Koenig u. H. Stahlecker, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 79, 159 [1952].

⁶ H. S. di Stefano, *Science* [Washington] 115, 316 [1952].

⁷ N. M. Sulkin u. A. Kuntz, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 73, 413 [1950].

⁸ H. Stich, *Z. Naturforschg.* 6 b, 259 [1951].

⁹ E. R. Fisher, *Stain Technol.* 28, 9 [1953].

¹⁰ N. M. Sulkin, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 78, 32 [1951].

Vorbehandlung	mg PNS-P g Gewebe	mg DNS-P g Gewebe	Im Gewebe verblieben	
			PNS [%]	DNS [%]
Carnoy Zimmertemp. (+ 20 [°C]) 2 Stdn.	0,43	0,184	80	100
Carnoy Zimmertemp. (+ 20 [°C]) 4 Stdn.	0,41	0,167	76	(97)
Carnoy Zimmertemp. (+ 20 [°C]) 20 Stdn.	0,243	0,156	41	86
Carnoy kalt (+ 4 [°C]) 2 Stdn.	0,523	0,181	(96)	100
Carnoy kalt (+ 4 [°C]) 20 Stdn.	0,382	0,163	71	(95)
Gefriertrocknung —	0,54	0,175	100	100

Tab. 1. Vergleich des Nucleinsäuregehaltes in der Meerschweinchenleber nach verschiedenen histologischen Vorbehandlungen. Die in Klammern gesetzten Prozentwerte sind nicht signifikant für Verluste der Nucleinsäuren.

legen und extrahierbar machen. Die vergleichende Betrachtung von so behandelten Schnitten erlaubt dann Rückschlüsse auf Lokalisation und Menge der im Gewebe vorliegenden PNS (vgl. Abb. 1* und 2). Voraussetzung für die Zuverlässigkeit dieses Untersuchungsverfahrens ist: 1. daß die vorausgehende Fixierung des Gewebes nicht zu stärkerer Extraktion der PNS führt, 2. daß durch die jeweils angewandte Hydrolysemethode die Extraktion der PNS aus den Kontrollabschnitten möglichst vollständig ist. Um die optimalen Bedingungen zur Erfüllung dieser Forderungen zu finden, wurden von zahlreichen Autoren Untersuchungen durchgeführt, die sich vor allem auf die histologische Beurteilung des Färbefeffektes stützen (für die Ribonuclease-Methode vgl. insbesondere *Stowell* und *Zorzoli*¹¹). Einige Ergebnisse eigener Untersuchungen über die autoradiographische Darstellung der Nucleinsäuren in Gewebsschnitten¹² waren Anlaß, mit dem dazu ausgearbeiteten Fraktionierungsverfahren den Einfluß der Fixierung auf den PNS-Gehalt des Gewebes nunmehr auch quantitativ zu testen. Mit dieser histochemische und makrochemische Befunde vergleichenden Methodik wurden zunächst zwei Fragen geprüft: Der Einfluß der Fixierung mit Carnoyscher Lösung sowie die Extrahierbarkeit der PNS mittels Ribonuclease.

Die quantitative Bestimmung der Nucleinsäuren erfolgte nach der *Schmidt-Thannhauser*-Methode¹³ in der von *Lavik* und Mitarbb.¹⁴ angegebenen Modifikation. Für die Analyse der PNS wurde das Phosphat der Phospho-Proteine, die ebenfalls quantitativ bestimmt wurden, durch Fällung aus dem alkalischen Hydrolysat des Gewebes isoliert. — Zur Untersuchung wurden frisch abgewogene Gewebsmengen verwandt, die nach Fixierung und Einbettung mit dem Mikrotom völlig zu 20 μ dicken Schnitten verarbeitet wurden. Alle Schnitte wurden dann gemeinsam verschiedenen histologischen Behandlungen unterworfen und nach deren Abschluß chemisch-quantitativ aufgearbeitet. Einzelheiten der dazu entwickelten Technik sind an anderer Stelle ausführlicher beschrieben¹⁵. Es wurden jeweils wenigstens 3 Parallel-

Analysen durchgeführt; der mittlere Fehler der Einzelwerte lag zwischen 10 und 20 Prozent. Die quantitative Auswertung histochemischer Reaktionen zeigt verständlicherweise eine größere Streuung der Analysenwerte, als es bei Untersuchungen am Gewebsbrei üblich ist.

Das von *Carnoy* (*Romeis* „Mikroskopische Technik“ § 226) angegebene Fixationsgemisch besteht aus 6 Teilen absol. Alkohol, 3 Teilen Chloroform und 1 Teil Essigsäure. Es wird für histochemische Untersuchungen der Basophilie recht häufig verwendet. Vergleicht man histologische Präparate, die unter gleichen Bedingungen mit Toluidinblau gefärbt wurden, so findet man nach länger dauernder Carnoy-Fixation (Abb. 1 a) eine wesentlich geringere Farbintensität als nach Fixierung durch Gefriertrocknung¹⁶. Die Ergebnisse der entsprechenden quantitativ-chemischen Untersuchungen an Schnitten der Meerschweinchenleber zeigt Tabelle 1. Man sieht, daß bei 20-stdg. Einwirken von Carnoyscher Lösung etwa die Hälfte der PNS aus dem Gewebe verloren gehen kann. Diese Verluste lassen sich einschränken durch kürzere Dauer der Einwirkung des Fixierungsmittels, aber auch dadurch, daß das Gewebe bei rel. tiefer Temperatur (+ 4° C) fixiert wird. Fixierung durch Gefriertrocknung führt hingegen zu keinen Verlusten der Nucleinsäuren, wie vergleichende quantitative Untersuchungen am Gewebshomogenisat ergaben. Die Desoxypentosenucleinsäure (DNS) ist gegenüber der Säureeinwirkung des Fixierungsmittels wesentlich unempfindlicher als die PNS (Tab. 1), während die Phospho-Proteine durch Carnoysche Lösung gar keine Verluste erleiden¹⁵. Da sich die PNS durch Säuren verhältnismäßig leicht hydrolysieren läßt (von dieser Tatsache wird ja bei zahlreichen histochemischen Reaktionen Gebrauch gemacht²⁻⁹), ist es nicht verwunderlich, daß die Fixierung mit Carnoyscher Lösung zu Verlusten der PNS führt.

Hinsichtlich der PNS-Extraktion hatten frühere Untersuchungen¹² bereits gezeigt, daß eine quantitative Her-

¹¹ R. E. *Stowell* u. A. *Zorzoli*, *Stain Technol.* **22**, 51 [1947].

¹² E. *Harbers* u. K. *Neumann*, *Z. Naturforschg.* **9b**, 175 [1954].

¹³ G. *Schmidt* u. S. J. *Thannhauser*, *J. biol. Chemistry* **161**, 83 [1945].

¹⁴ P. S. *Lavik*, H. *Harrington* u. G. W. *Buckalo*, *Western Res. Univ., Atomic Energy Med. Res. Proj., Unclassified Docum., NYO-1625* (1951).

¹⁵ E. *Harbers* u. R. *Backmann*, im Druck.

¹⁶ K. *Neumann*, *Grundriß der Gefriertrocknung*; *Musterschmidt-Verlag, Göttingen*, 2. Aufl. 1955.

* Abb. 1, 1 b u. 2 s. Tafel S. 356 a.

Vorbehandlung	Dauer d. Einwirkg. der Ribonuclease ⁺ (10 mg/100 ml) [Stdn.]	Im Gewebe verbliebene	
		PNS [%]	DNS [%]
Carnoy (+ 4°C, 20 Stdn.)	6	19	90
Carnoy (+ 20°C, 20 Stdn.)	6	21	93
Gefriertrocknung	2	24	(97)
Gefriertrocknung	4	16	—
Gefriertrocknung	6	11	87
Gefriertrocknung	12	9	80
Kontrollen	—	100	100

* Die kristalline Ribonuclease wurde von der Worthington Biochemical Sales Co., Freehold/New Jersey, USA, bezogen.

Tab. 2. Einfluß von Fixierung und Dauer der Einwirkung kristalliner Ribonuclease auf die Extrahierbarkeit der Pentosenucleinsäure aus Gewebsschnitten (Meerschweinchenleber). 0,1-m. Veronal-Acetat-Puffer, p_H 6,8; Temperatur 37° C.

auslösung der PNS aus Gewebsschnitten unter Schonung der übrigen Gewebsbausteine praktisch nicht möglich ist. Als relativ wirksamstes Verfahren erwies sich die enzymatische Hydrolyse der PNS durch Ribonuclease. Die folgenden Versuche, deren Ergebnisse in Tab. 2 zusammengestellt sind, sollten klären, welches die optimalen Bedingungen für den Ribonuclease-Test seien. Wie die Werte der Tab. 2 zeigen, ist die Angreifbarkeit der PNS im Gewebe nach Carnoyscher Fixierung zwar recht gut, jedoch wesentlich besser nach Fixierung durch Gefriertrocknung. Eine Verlängerung der Dauer der Einwirkung des Enzyms führt nach mehr als 6 Stdn. praktisch zu keiner weiteren Extraktion der PNS. Es bleibt demnach in der für diese Untersuchungen verwendeten Meerschweinchenleber auch unter optimalen Bedingungen etwa 10% der PNS im Gewebe zurück. Dieser Rest läßt sich auch nicht durch Erhöhung der Enzymkonzentration verringern. Ursache mag u. a. sein, daß die aus dem Pankreas isolierte Ribonuclease ihr Substrat nicht völlig in Mononucleotide zerlegen kann, sondern nach Abspaltung vorwiegend pyrimidinhaltiger Nucleotide noch relativ hochpolymere Polynucleotide zurückbleiben¹⁷⁻²⁰, die sich offenbar nicht quantitativ aus den Gewebsschnitten extrahieren lassen. Wie die Tab. 2 ferner zeigt, wird durch die Ribonuclease-Einwirkung ebenfalls die DNS-Menge

im Gewebe herabgesetzt. Dies mag z. T. darauf zurückzuführen sein, daß die verwendete Ribonuclease nicht völlig frei war von Trypsin, das durch Proteolyse von Histonen zur Herauslösung von DNS führen kann²¹. Es scheint jedoch, daß nach Fixierung durch Gefriertrocknung die Wirkung gewebs-eigener Desoxyribonuclease oder Proteasen ursächlich an diesen Verlusten der DNS beteiligt ist.

Die geschilderten Untersuchungen beschränken sich auf den Vergleich zweier Fixierungsarten. Diese Einschränkung ergab sich daraus, daß die Fixierungsmittel im allgemeinen das Gewebe so verändern, daß die Anwendung der geläufigen quantitativen Nucleinsäure-Bestimmungen unmöglich wird. Das gilt sowohl für die häufig benutzte Methode von Schneider²² (vgl. dazu u. a. Herrmann und Speck²³) wie für das Schmidt-Thannhauser-Verfahren. So gelang es z. B. nicht, an formol-fixiertem Gewebe zuverlässige quantitative Analysen durchzuführen. Für die Carnoysche Lösung liegen die Verhältnisse relativ günstiger, ohne daß indessen alle Fehlermöglichkeiten ganz ausgeschlossen werden konnten. So mag die bei der chemischen Aufarbeitung des Gewebes erforderliche Extraktion mit Trichloressigsäure zugleich einen kleinen Teil der durch das Fixierungsmittel anhydrolysierten Nucleinsäuren erfassen und damit deren Verluste etwas größer erscheinen lassen. Diese Fehlermöglichkeit berührt jedoch nicht die prinzipielle Gültigkeit der geschilderten Befunde, daß die Fixierung durch Gefriertrocknung eine Extraktion der Nucleinsäuren vermeidet und sie zugleich in einem Zustand erhält, in welchem sie einer enzymatischen Hydrolyse besonders gut zugänglich sind. Sylvén^{24, 25} konnte nach üblicher Gewebefixierung in beträchtlichem Maße Nucleotide in der Fixationsflüssigkeit nachweisen. Sandritter und Hartleib²⁶, die ebenfalls mit quantitativ-chemischen Methoden den Einfluß von Fixierungsmitteln auf die Nucleinsäuren untersuchten, kamen zu Ergebnissen, die den hier geschilderten Befunden entsprechen. Von Sylvén wurden die Nucleinsäure-Verluste ferner färberisch demonstriert; die Basophilie des Cytoplasmas war nach Fixieren in Carnoyscher Lösung wesentlich schwächer als nach Gefriertrocknung. Dementsprechend waren die Kontraste zwischen Kontrollpräparaten und den mit Ribonuclease behandelten am ausgeprägtesten nach Fixierung durch Gefriertrocknung (vgl. dazu Abb. 1a und b und Abb. 2). Diese Befunde Sylvéns werden durch unsere Untersuchungen bestätigt; darüber hinaus zeigen diese, daß nach Gefriertrocknung die PNS in einer besonders gut enzymatisch hydrolysierbaren Form im Gewebe erhalten bleibt.

¹⁷ C. E. Carter u. W. E. Cohn, J. Amer. chem. Soc. 72, 2604 [1950].

¹⁸ G. Schmidt, R. Dubiles u. S. J. Thannhauser, J. cellular comp. Physiol. 38, Suppl. 1, 61 [1951].

¹⁹ G. Schmidt, R. Cubiles, N. Zöllner, L. Hecht, N. Strickler, K. Sereidarian, M. Seraidarian u. S. J. Thannhauser, J. biol. Chemistry 192, 715 [1951].

²⁰ E. Volkin u. W. E. Cohn, J. biol. Chemistry 205, 767 [1953].

²¹ H. Friedrich-Freksa (persönliche Mitteilung).

²² W. C. Schneider, J. biol. Chemistry 161, 293 [1945].

²³ H. Herrmann u. L. B. Speck, Science [Washington] 119, 221 [1954].

²⁴ B. Sylvén, Acta Union. Intern. contre le Cancer 7, 708 [1951].

²⁵ B. Sylvén, Freezing and drying, report of a symposium; Inst. of Biol., London W.C.I., 169 [1951].

²⁶ W. Sandritter u. J. Hartleib, Acta Histochemica, im Druck.