

Art der Vorbehandlung	A = Analysenwert B = % des Frischgewebes	Zahl	mg P in 2 cm ³ Gewebe				mg NS in 2 cm ³ Gewebe (UV.)			
			DNS.	σ	RNS.	σ	DNS.	σ	RNS.	σ
1. Frischgewebe . . .	$\frac{A}{B}$	10	0,373 100	0,0097	0,697 100	0,006	3,7 100	0,21	17,9 100	0,96
2. Formalinfixation .	$\frac{A}{B}$	10	0,374 100,2	0,013	0,675 96,8	0,008	4,3 116,2	0,30	15,8 88,2	1,02
3. Carnoy-Fixation .	$\frac{A}{B}$	10	0,315 84,4	0,0136	0,695 99,6	0,003	4,5 121,6	0,32	17,4 97,2	0,20
4. Frischgewebe . . .	$\frac{A}{B}$	10	0,613 100	0,004	1,10 100	0,02	5,2 100	0,3	21,2 100	0,97
5. Formalinfixation, Paraffineinbettung	$\frac{A}{B}$	10	0,607 99,0	0,007	1,09 99,9	0,01	5,1 98,0	0,14	22,0 103,7	1,32
6. Carnoy-Fixation, Paraffineinbettung	$\frac{A}{B}$	10	0,620 101,1	0,008	1,14 103,6	0,03	4,4 84,6	0,26	25,0 117,9	1,79

Hierbei wurde als Eichkurve eine 9,3% Phosphor enthaltende DNS.-Lösung verwendet mit einer Extinktion von 0,905 (0,005%ige Lösung). Die Tabelle zeigt, dass die Vorbehandlung des Gewebes (Fixierung, Einbettung und Nachbehandlung) nicht zu einem messbaren Nukleinsäureverlust führt. Die Ergebnisse sind statistisch gesichert. Die höheren Nukleinsäure-Phosphor-Werte unter Nr. 4–6 der Tabelle sind damit zu erklären, dass in diesen Versuchen die Leber eines jüngeren Tieres verwendet wurde. Ausschlaggebend ist hier die Übereinstimmung der Werte des Frischgewebes mit dem vorbehandelten Gewebe.

Die papierchromatographischen Untersuchungen der Fixierungsmittel und der bei der Einbettung und Nachbehandlung angewandten Flüssigkeiten zeigen, dass keine Nukleinsäure in Lösung gegangen ist (Färbung mit Gallozyaninchromalaun). Dagegen konnten in den Fixierungsflüssigkeiten (Carnoy und Formalin) und in dem bei der Einbettung benutzten 70%igen Alkohol Spuren von Eiweiss und Aminosäuren (Polypeptide) nachgewiesen werden (Kontaktphotographie, Färbung mit Amidoschwarz und Ninhydrin).

Diskussion. Im Gegensatz zu anderen Untersuchern fanden wir bei der Vorbehandlung von Lebergewebe keinen Verlust an Nukleinsäure. SYLVEN berichtet über einen beträchtlichen Masseverlust des Gewebes nach Fixierung mit Formalin, Carnoy und absolutem Alkohol (24 h Zimmertemperatur), der auf eine Lösung von Fetten, Eiweisskörpern und Nukleinsäuren zurückzuführen sei. Auch HARBERS und NEUMANN finden bei Carnoy-Fixation bei Zimmertemperatur einen zunehmend stärkeren RNS.-Verlust des Gewebes bis zu 60% (in Abhängigkeit von der Fixationsdauer), während bei der Fixation in der Kälte (4°) keine Nukleinsäure in Lösung geht. Diese Untersuchungen zeigen, dass bei säurehaltigen Fixationsmitteln bei längerer Einwirkung und höherer Temperatur RNS. leicht in Lösung geht. Dieser Befund wird verständlich, wenn man bedenkt, dass mit verschiedenen Säuren (HClO₄, HCl und anderen) und schon mit heissem Wasser die RNS. leicht hydrolysiert werden kann und diese Substanzen teilweise als Ersatz für die Ribonuklease angewendet werden. Die DNS. scheint dagegen wesentlich stabiler zu sein.

Bei der Fixation mit Formalin (50%ig, 20%igem Formalin und Alkoholformalin 9:1) fanden SIBATANI und FUKUDA übereinstimmend mit unseren Untersuchungen keinen Nukleinsäureverlust des Gewebes.

Auch MOBERGER¹ beobachtete keinen messbaren Verlust des Trockengewichtes (Röntgenabsorption) beim Vergleich von formalinfixiertem und gefriergetrocknetem Material. KAUFMANN² *et al.* sehen eine geringe Lösung von Proteinen nach Carnoy-Fixation. Bei der Fixation mit Formalin und Carnoyscher Flüssigkeit hat man demnach mit einem geringen Proteinverlust des Gewebes zu rechnen. Man muss aber hierbei in Rechnung setzen, dass diese geringen Proteinmengen auch aus dem Blutplasma oder den Erythrozyten stammen können.

Weitere Untersuchungen an gefriergetrocknetem Material sind im Gange.

W. SANDRITTER und J. HARTLEIB

Senckenbergisches Pathologisches Institut der Universität Frankfurt am Main, den 14. April 1955.

Summary

Quantitative chemical determination of nucleic acid shows that no loss of nucleic acid occurs on fixation with formalin and CARNOY's solution (24 or 2 h at room temperature) and after dehydration and embedding of the tissues. Small amounts of protein were shown in the fixative solution.

¹ G. MOBERGER, *Acta Radiol. Suppl.* Stockholm 1954, 112.
² B. P. KAUFMANN, M. R. McDONALD, H. GAY, K. WILSON, R. WYMAN und N. OKUDA, *Carnegie Year Book* 47, 144 (1948).

Über
6-(4'-Pyridyl)-3-mercaptop-1,2,4-triazin-5-on

In einer früheren Mitteilung wurde über die Eigenschaften einer Reihe von substituierten Mercapto-triazinonen berichtet¹. Bei der Weiterbearbeitung dieses Gebietes zeigte sich, dass das dort beschriebene 6-(4'-Pyridyl)-3-mercaptop-1,2,4-triazin-5-on nicht einheitlich war, indem bei der Herstellung durch Zersetzung teilweise ein Nebenprodukt entsteht.

¹ R. E. HAGENBACH, E. HODEL und H. GYSIN, *Angew. Chemie* 66, 359 (1954); vgl. *Exper.* 10, 62 (1954).

Wird das Oxim des 4-Pyridyl-glyoxylsäureesters mit verdünnter Mineralsäure in Gegenwart von Thiosemicarbazid gespalten, so decarboxyliert die Säure teilweise, und es entsteht neben dem Pyridyl-mercapto-triazinon auch Isonicotinaldehyd-thiosemicarbazon, ein schon bekanntes Tuberkulostatikum, das sich als Hauptträger der Wirksamkeit erwies¹. Unter gleichen Versuchsbedingungen wird ein ungefähr konstantes Gemisch der beiden Substanzen erhalten, aus dem sich mit schwachen Basen das Mercapto-triazinon infolge der Schwerlöslichkeit seiner Salze nur schwierig abtrennen lässt. Das reine Pyridyl-mercapto-triazinon schmilzt, aus wässrigem Pyridin umkristallisiert, bei 308° unter Zersetzung (Koflerblock).

Bei keinem der anderen von uns beschriebenen Mercapto-triazinone konnte eine derartige Decarboxylierung beobachtet werden.

R. E. HAGENBACH und H. GYSIN

Wissenschaftliche Laboratorien der J. R. Geigy AG.,
Basel, den 31. Mai 1955.

Summary

In synthesizing 6-(4'-pyridyl)-3-mercapto-1,2,4-triazin-5-one from the oxime of 4-pyridyl-glyoxylic acid, isonicotinaldehyde-thiosemicarbazone is obtained through decarboxylation as a by-product, which is mainly responsible for the tuberculostatic properties.

¹ Vgl. J. HIRSCH, *Naturwissenschaften* 41, 142 (1954).

Colorimetric and Spectrophotometric Titration of 5-Hydroxyindoleacetic Acid

5-Hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA) has been shown to be a normal constituent of the urine of omnivorous and carnivorous mammals and probably of other Vertebrates¹.

Although it cannot be excluded that 5-HIAA comes from 5-hydroxytryptophan without passing through 5-hydroxytryptamine(5-HT)², it seems probable that the main part of the urinary 5-HIAA derives from the oxidative deamination of 5-HT.

The quantitative estimation of the urinary output of 5-HIAA has been suggested as the method of preference for a comprehensive evaluation of the general metabolism of 5-HT in the organism. Of course, we cannot expect to get by this method any reliable information on the turnover of 5-HT in the central nervous system, since brain 5-HT makes up hardly 1% of the total 5-HT in the mammalian organism³.

The two following procedures may be employed in the quantitative titration of 5-HIAA in pure solutions or in watery eluates of 5-HIAA spots from paper chromatograms.

¹ V. ERSPAMER, *J. Physiol.* 127, 118 (1955); *Pharmacol. Rev.* 6, 425 (1954). – E. TITUS and S. UDENFRIEND, *Federation Proc.* 13, 411 (1954).

² S. UDENFRIEND, Personal communication to V. ERSPAMER (1955).

³ V. ERSPAMER, *Medicina, Parma* (in the Press). – P. CORREALE, forthcoming publication.

p-Dimethylaminobenzaldehyde reaction. To 2 volumes of the liquid under investigation 1 volume of a freshly prepared 2% solution of *p*-dimethylaminobenzaldehyde in concentrated HCl is added. The tubes are then placed in a water bath at 56–58° for 10–12 h.

The coloured solutions are read, within 3 h, in a Beckman spectrophotometer at 600 m μ . LAMBERT and BEER's law is valid between 2 and 25 μ g 5-HIAA per milliliter liquid (Fig. 1).

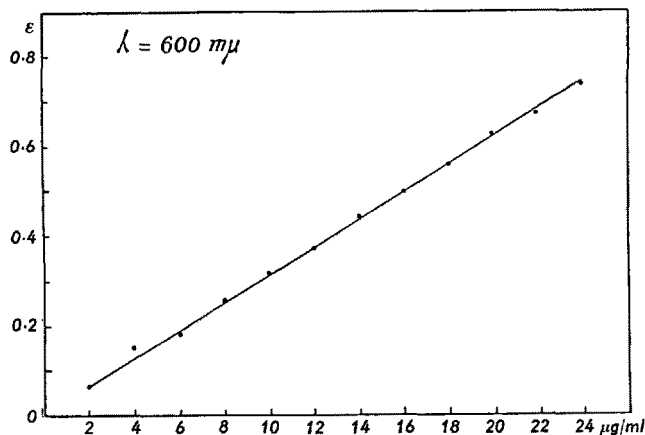


Fig. 1.

Ultraviolet absorption spectrum. Aqueous solutions of 5-HIAA, adjusted to pH 7, show in ultraviolet a maximum of absorption at 221 m μ . LAMBERT and BEER's law is valid between 1 and 15 μ g 5-HIAA per milliliter (Fig. 2).

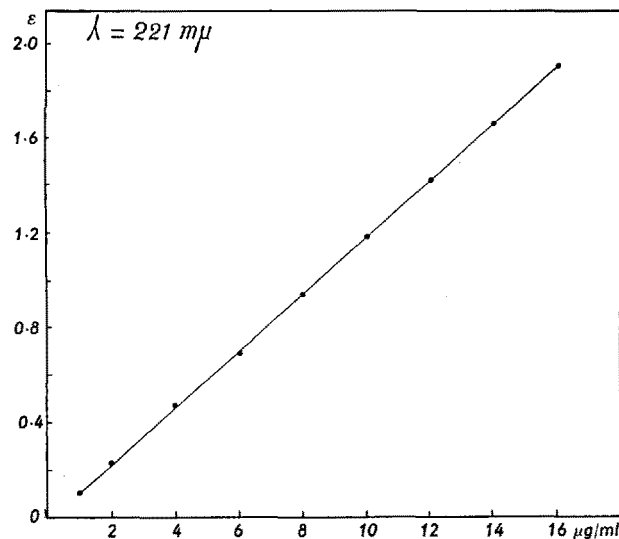


Fig. 2.

Neither of the above methods can be applied directly to biological liquids or crude extracts of biological materials, owing to the presence of disturbing substances. On eluates of urine chromatograms we have succeeded so far in obtaining satisfactory results only with the first method, and only in the case of intense and pure 5-HIAA spots.

P. CORREALE

Pharmacological Institute, University of Bari, Italy,
April 25, 1955.