

Summary

Since the morphogenesis of teeth is ruled by organizers (inductors) the change of position of one of them could have brought about an evolution of the denture such as is found in the *Creodontia* and Carnivores. Modern techniques of organ cultivation will perhaps solve some other paleontological problems (reappearance of teeth whose germs miscarry, modification of the size of the canines, which would permit us to suppose a certain reversibility).

PRO EXPERIMENTIS

Sharpening of Knives for Ultramicrotomy

Ultrathin tissue sectioning for electron microscopy demands among other things a cutting edge of very high quality. The best edges are up to the present undoubtedly obtained by handpolishing razor blades¹, but this method has some definite drawbacks. In order to obtain better and more reproducible sharpening results we have investigated several kinds of knife-steel and, furthermore, worked out a special sharpening method.

The steel in ordinary microtome knives and razor blades is not particularly suitable for ultramicrotome knives. The reason for this is firstly the richness in very hard iron carbide particles which sometimes are wrenched out of the martensite during the sharpening and thus spoiling the edge. Secondly, the lack of corrosion resistance makes it impossible to use a knife for sectioning for more than a couple of hours.

Testing several kinds of steel we have found that a special steel containing 0.5% carbon and 13% chromium is very suitable for our purpose. The low carbon percentage makes it possible to obtain a steel composed mainly of martensite with very few or no carbide particles. By a special hardening process and by cautious tempering the steel is given a high hardness (about 800 Vicker units). The corrosion resistance is very good which is of vital importance. (This steel is produced by the Steel Company of Uddeholm.)

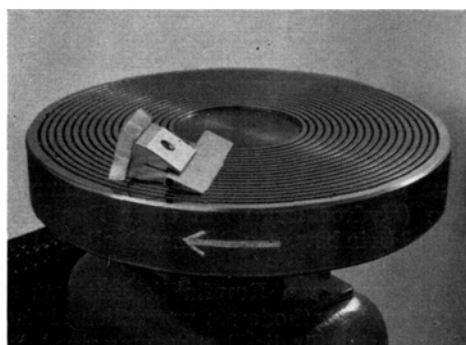


Fig. 1.

The knives of this special steel are sharpened by a lapping technique², carried out in two phases on a lapping machine. This consists of a cast iron plate fixed on a vertical axis and rotatable at variable speeds. In the first phase of lapping a special lapping disc of cast iron is used, the surface of which is extremely even and smooth and provided with circular grooves in order to

prevent suction of the knife (Fig. 1). In the second phase of lapping this cast iron disc is exchanged for a mirror grade glass plate.

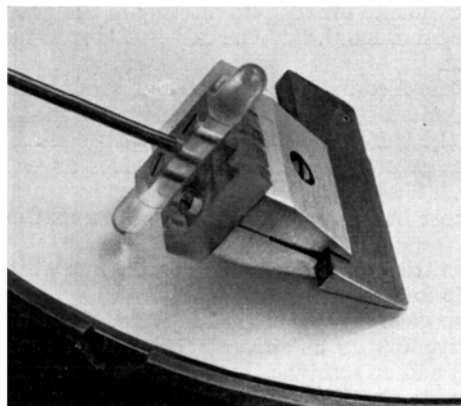


Fig. 2.

While sharpening the knife is mounted in a special fixture that always holds the knife in the same position. The fixture is provided with a perspex back that is resting on the lapping disc during the sharpening and so determines the bevel angle (see Fig. 1). For lapping against cast iron the fixture gives a bevel angle of 30°. While lapping against glass the knife is moved to a fixture the back of which is resting with one point on the glass and giving a bevel angle of 50° (Fig. 2.)

Before lapping against cast iron a thin layer of a paste, consisting of chromium oxide in oil is carefully rubbed into the lapping disc. The disc is rotating at about 40 r.p.m. The knife in its fixture is placed with the edge against the direction of rotation and moved to and fro in radial direction. The knife is turned over at intervals of about 15 s. The facet surfaces obtained have a high evenness and smoothness.

If the knife has big scratches on its facets or if it has not previously been used for ultramicrotomy we carry out an additional lapping against cast iron before the phase just described. We then use a lapping disc of the above kind and the same fixture (i.e. the bevel angle is 30°). To this disc we apply a paste consisting of carborundum which gives a higher rate of material removal but a coarser facet surface.

After having cleaned the knife in white spirits and mounted it in the second fixture the lapping against glass is carried out¹. For this no abrasive is used, on the contrary it is carried out in a 3% sodium bicarbonate solution containing one drop of detergent per 25 ml. The rotation velocity of the glass disc is about 10 r.p.m. No pressure is exercised on the knife during sharpening as the fixture is so balanced that its weight gives the adequate pressure.

Lapping against glass for 2–3 min gives facet surfaces of extreme evenness and smoothness and a continuous edge line that is perfectly straight and uniform. The width of these final facet surfaces is 10–15 μ , which is quite sufficient. (The inspection of the sharpening results is made in a darkfield microscope with a resolving power of about 0.7 μ and magnification of 700 times.)

¹ "Lapping" is probably not the adequate term for this part of the sharpening since "lapping" signifies a removal of material and the glass phase implies very likely a smoothing out of the facets without any significant removal. However, the term "lapping" is used here for the sake of simplicity.

¹ F. SJÖSTRAND, J. Cell. Comp. Physiol. 42, 15 (1953).

² O. HALLÉN, Lab. Invest. (in press).

The swift production of the final facets is possible owing to the fact that the bevel angle is altered previous to the lapping against glass. Owing to this only a fraction of the cast iron lapped facets must be smoothed out. The pre-requisite for such an altering of the bevel angle is, on the other hand, that the cast iron lapped facets are very even.

Using the described steel and technique it is simple to sharpen knives of any kind, provided that the fixture is fitted to the knife. In our laboratory we use knives of the same size as ordinary microtome knives as well as of razor blade shape.

The most important advantages of our method seem to be:

(1) A cutting facet of a small but uniform width along the whole knife.

(2) The glass lapping is performed without any kind of abrasive (as no significant removal of material is required) and so scratches in the facets are avoided.

(3) Due to the rather extensive mechanization of the technique it requires no special dexterity or long practice and gives an almost 100% yield.

(4) The special, stainless steel is very suitable for the sharpening procedure and makes it possible to section with the same knife for several days without re-sharpening.

R. EKHOLM, O. HALLÉN, and
T. ZELANDER

Departments of Anatomy and Histology, University of Gothenburg, April 27, 1955.

Zusammenfassung

Die Verfasser beschreiben eine Methode zur Herstellung von Messerschneiden zum Ultramikrotomgebrauch. Das Material des Messers besteht aus rostfreiem Stahl, der aus fast reinem Martensit aufgebaut ist. Das Schärfen wird auf einer speziellen Läppmaschine ausgeführt und umfasst zwei Phasen. Die erste, das Läppen gegen Gusseisen, gibt dem Messer einen Schneidenwinkel von 30°. Die zweite und letzte Schärfungsphase wird mit Spiegelglas ausgeführt und gibt einen Schneidenwinkel von 50°.

PRO EXPERIMENTIS

Die Bestimmung von Dibenamin im biologischen Material

Für die Bestimmung von Dibenamin (N,N-Dibenzyl- β -chloräthylamin) und dibenaminähnliche Verbindungen benutzten wir bisher die von BRODIE und Mitarbeitern¹ angegebene Methode, nach der Dibenaminalkohol (N,N-Dibenzyl- β -hydroxyäthylamin) mit Methylorange ein Molekülkomplex bildet, dessen Konzentration kolorimetrisch bestimmt werden kann. Dibenamin selbst geht keine Molekülverbindung mit Methylorange ein und muss deshalb durch alkalische Hydrolyse zum Alkohol umgesetzt werden. Abgesehen davon erweist sich das Verfahren als umständlich und nicht sehr empfindlich. Die ungenügende Genauigkeit dieser Methode dürfte im wesentlichen darauf zurückzuführen sein, dass einfache Azofarbstoffe eine zu geringe Neigung zur Adduktbildung aufweisen. Es wurde deshalb eine neue Nachweismethode für Dibenamin und dibenaminartige Verbindungen entwickelt, die nicht nur methodisch wesent-

lich einfacher ist, sondern auch genauere Bestimmungen zulässt.

Für die neue Methode verwenden wir Bromkresolpurpur, 5,5'-Dibromo-o-kresolsulphthalein, als Adduktbildner. Dieser Farbindikator bildet mit vielen aromatischen Basen benzollösliche Farbstoffadditionsverbindungen, die analytisch folgendermassen angewendet werden: Die vom organischen Lösungsmittel (Benzol) aufgenommenen Addukte werden mit NaOH zersetzt. Die Base verbleibt im Lösungsmittel, der Farbstoff geht in die wässrige Phase und kann dort kolorimetrisch bestimmt werden.

Die zu untersuchende wässrige Dibenaminlösung (10 ml) wird in einem Scheidetrichter nach Zusatz von 5 ml Phosphatpuffer nach SÖRENSEN (pH 5,2) und 5 ml Bromkresolpurpurlösung¹ mit 50 ml Benzol 2 min geschüttelt. Die wässrige Phase wird abgetrennt und nochmals mit 50 ml Benzol ausgeschüttelt. Die beiden Benzolauszüge werden vereint, filtriert und zweimal mit je 10 ml n/20 NaOH ausgeschüttelt. Die blau-violetten Natronlaugenextrakte werden vereinigt und mit n/20 NaOH nach Filtration auf 25 ml aufgefüllt. Mit dem Pulfrich-Photometer (Filter S 59², 2-cm-Küvette, Vergleichslösung *Aqua dest.*) erfolgt die Messung der Extinktion. Die Eichkurve entspricht im Bereich von 25 bis 400 γ pro 10 ml dem Lambert-Beerschen Gesetz.

Die Bildung der Farbstoffadditionsverbindung mit Bromkresolpurpur ist stark pH-abhängig. Die Kontrolle erfolgte mit der Jenaer Glaselektrode in Verbindung mit dem Nüsslein-Messverstärker (Typ 140).

Bestimmung von Dibenamin im Urin: Zur Einhaltung des optimalen pH-Wertes von 5,2 wird zweckmässig der Urin mit verdünnter Phosphorsäure auf ein pH von etwa 5,3 gebracht, damit die Einstellung durch den Phosphatpuffer gesichert ist. Die Bestimmung erfolgt, wie oben beschrieben. Die Blindwerte einer Reihe normaler Urine lagen bei dem eingehaltenen optimalen pH-Wert sehr niedrig und konstant.

Bestimmung von Dibenamin im Serum: 1 ml Schweineserum wird mit 1–2 Tropfen 1 n HCl versetzt und 14 ml Phosphatpuffer zugegeben (pH 5,2). Bei dieser Bestimmung wird 4 min mit 2mal 50 ml Benzol ausgeschüttelt.

Bestimmung von Dibenaminalkohol: Die Additionsverbindung entsteht im stärker sauren pH. Die wässrige Dibenaminlösung bzw. der dibenaminhaltige Urin werden durch Alkalisierung und zweistündige Erwärmung auf 40° hydrolysiert. Danach wird mit 2 n HCl auf pH 4,5 eingestellt und wie oben ausgeschüttelt. Als Vergleichslösung dient *Aqua dest.* bzw. Leerurin.

Die neue Methode ermöglicht die Bestimmung von Dibenamin (Hydrochlorid) mit einer Empfindlichkeit von 2,5 γ /cm³ Urin bzw. von Dibenaminalkohol 5,0 γ /cm³ Urin.

Neben der grösseren Empfindlichkeit hat sich die Bromkresolpurpurmethode als wesentlich einfacher erwiesen. Sie hat sich für die Bestimmung von Dibenamin und dibenaminartigen Verbindungen in Urin und Serum für Reihenuntersuchungen bewährt.

H. HOFMANN, K.-H. BOLTZE und
D. WEYLAND

Pharmakologisches Institut der Friedrich-Schiller-Universität Jena, den 15. Mai 1955.

¹ Zur Bereitung der Bromkresolpurpur-Farblösung löst man 0,2 g Bromkresolpurpur in 50 cm³ *Aqua dest.* unter Zusatz von 3,2 cm³ n/10 NaOH und füllt mit *Aqua dest.* auf 250 cm³ auf.

² Für Dibenamin-Hydrochlorid wurde ein Absorptionsmaximum (100 γ /10 ml *Aqua dest.*, Schichtdicke $s = 2$ cm; Filter S = 59) von 5820 Å bestimmt.

¹ B. B. BRODIE und Mitarbeiter, J. Pharmacol. exp. Ther. 106, 166 (1952).