

Die beschriebenen Versuche wurden mit dem Ziele durchgeführt, mittels der vitalen Gefrierschnitte das Repertoire der Möglichkeiten zum In-vitro-Studium menschlicher Tumoren zu erweitern. Darüber hinaus meinen wir, dass die Methode eventuell auch allgemein biologisch in folgenden Richtungen nützlich werden könnte: 1. Es könnte ganz generell möglich werden, vitale Gewebe exakt histologisch zu untersuchen. Das gefärbte histologische Präparat, das in jedem Falle eine Momentaufnahme darstellt, würde so durch die Betrachtung der Dynamik des lebenden Gewebes ergänzt werden können. 2. Vitale Gefrierschnitte könnten als Starter für organotypische Gewebekulturen verwendet werden. 3. Die Methode könnte ausreichend dünne, definierte Gewebeschnitte für biochemische, autoradiographische und ähnliche Untersuchungen liefern¹.

Summary. The paper describes some experiments designed to develop a new method for in vitro studies of human tumours. After having frozen the tissue carefully, maintaining its vitality, we cut living tissue slides of 20–30 μ thickness. Such slides may possibly be a tool for vital histology, a starter for organotypic tissue culture and a defined tissue specimen for biochemical, autoradiographical and similar studies.

ST. TANNEBERGER

*Institut für Krebsforschung der Deutschen Akademie der Wissenschaften zu Berlin,
Bereich Robert-Rössle-Klinik, Abteilung Chemotherapie,
1115 Berlin-Buch (DDR), 27. September 1968.*

Analytisch-chemische Bestimmung nichtradioaktiver Stoffe mit einem Flüssig-Szintillationspektrometer durch Radiolumineszenz und Absorptionsphotometrie im Čerenkov-Licht

Die heutzutage kommerziell erhältlichen Flüssig-Szintillationszähler stellen mit ihren zwei Photomultiplierrohren in Koinzidenzschaltung und den zugehörigen Verstärker- und Impulshöhenanalysatoren ein beträchtliches instrumentales Potential dar. Deshalb liegt es nahe, diese Apparate, die speziell für die Bestimmung der Radiotracer geschaffen wurden, auch für anderweitige Messungen einzusetzen¹. Es sollen hier drei Techniken kurz erörtert werden, die es erlauben, einen Flüssig-Szintillationszähler ohne jede Änderung für die chemische Bestimmung nicht-radioaktiver Stoffe zu verwenden.

Die erste Technik beruht auf der Messung der Lumineszenz, die eine radioaktive Quelle in der zu untersuchenden Lösung hervorruft. Die von uns verwendete Quelle besteht aus einem dünnen elektrolytischen Belag von Plutonium-239 auf einem Platinblech von 11 \times 9 mm, welches durch einen Stiel am Deckel einer gewöhnlichen Messflasche befestigt ist und senkrecht axial in die Lösung zu tauchen kommt. Die Emissionsrate beträgt 2×10^4 dps. Es wurde ein α -Strahler eingesetzt, um die Erzeugung von Čerenkov-Strahlung, die die Messergebnisse unübersichtlich gemacht hätte, zu vermeiden. Indessen zeigte sich ein weicher β -Strahler (^3H als tritiumindizierter Toluol) ebenso brauchbar. Zahlreiche organische Stoffe sind radiolumineszent und können dadurch in einer Lösung, die diese Eigenschaft sonst nicht aufweist, quantitativ bestimmt werden. So lassen sich z. B. Bruchteile eines Prozents Benzol oder Toluol in Cyclohexan mit einer relativen Genauigkeit von besser als 1% mühelos bestimmen. Umgekehrt können Stoffe, die in einer radiofluoreszierenden Lösung eine chemische Löschwirkung aufweisen, durch die Messung des Lösungsgrades ebenfalls quantitativ analysiert werden. So lassen sich einige Zehntelprozente Cyclohexan in Toluol oder Benzol mit der gleichen Präzision bestimmen. Der Messbereich erstreckt sich von 0–100% der genannten Komponenten. Die Methode ist besonders empfindlich für starke Löschenzenzen; Biacetyl und Acetophenon können z. B. im 10^{-4} -bis- 10^{-3} -mg-Bereich einwandfrei quantitativ ermittelt werden. Ist keiner der Stoffe des zu analysierenden Systems radiolumineszent, so wird das betreffende Analysengut mit einer fluoreszierenden Lösung vermischt. Auf diese Weise lässt sich ein Cyclohexan-Cyclohexan-Gemisch in Toluol analysieren. Desgleichen kann der

Wassergehalt vom Äthylalkohol zwischen 0 und 5% Wasser durch Messung einer 100-mg-Probe in 20 ml einer Lösung, bestehend aus 19 ml Toluol + 0,2 ml Dioxan + 1 ml PPO/POPOP Szintillatorlösung, auf 0,1% genau ermittelt werden. Die Methode ist nicht spezifisch und eignet sich vor allem für die quantitative Bestimmung einer gegebenen Komponente in einer Mischung von bekannter qualitativer Zusammensetzung. Die Empfindlichkeit kann um einen Faktor 20–50 noch erhöht werden, wenn man die herkömmlichen Szintillationsmessflaschen durch Küvetten von 0,4–1 ml Inhalt ersetzt.

Die zweite Technik stellt eine Variante der Absorptionsphotometrie dar. Als Lichtquelle dient ein dickes Kapillarrohr aus Quarz, das am Deckel einer gewöhnlichen Messflasche axial befestigt ist. Das verwendete Čerenkov-Licht wird im Quarz durch die harte β -Strahlung eines im Kapillarraum eingeschlossenen radioaktiven Präparates erzeugt. Wir haben etwa $100 \mu\text{C}$ ^{90}Sr zusammen mit dem im radioaktiven Gleichgewicht befindenden ^{90}Y eingesetzt. Das Spektrum des emittierten Lichtes reicht vom IR bis zum UV, mit einer gleichmäßig wachsenden Verteilungsdichte in Richtung der abnehmenden Wellenlängen. Der nützliche Bereich ist im wesentlichen durch die Durchlässigkeit der sich im optischen Wege befindenden Geräte-wände sowie durch die spektrale Empfindlichkeit der Photomultiplierrohren bestimmt. Bei Verwendung einer genügend starken Quelle ist es möglich, durch Einlegen eines Lichtfilters zwischen Quelle und Lösung einen engeren Spektralbereich auszusondern. Eine Bestimmung geht derart vor sich, dass die Zählrate mit dem gewählten Lösungsmittel allein und sodann in Anwesenheit des betreffenden Stoffes gemessen wird, worauf die Konzentration des letzteren anhand einer früher aufgestellten Eichkurve ermittelt wird. Die Methode ist empfindlich und genau und zeichnet sich aus durch einen ausserordentlich ausgedehnten

¹ Dies wurde schon gemacht, siehe zum Beispiel die Mitteilung von S. ADDANKI, J. F. SOTOS und PH. D. REARICK in *Anal. Biochem.* **14**, 261 (1966). Indessen wurde bisher lediglich über die Verfolgung chemilumineszierender Prozesse berichtet, wozu die Szintillationszähler wenig geeignet sind, da in jenem Falle einzelne Photonen statt Szintillationen emittiert werden.

Messbereich. Natriumchromat lässt sich z. B. in Wasser zwischen 1 µg/ml und 50 mg/ml mit einer mittleren Genauigkeit von 0,5–2% bestimmen.

Bei der dritten Technik wird als Lichtquelle ein fluoreszierender Stoff verwendet, der durch die α - oder β -Strahlung eines radioaktiven Präparates angeregt wird. Die Messanordnung ist ganz analog derjenigen, die bei der zweiten Methode verwendet wird. Durch die Wahl des Szintillators kann das Spektrum des emittierten Lichtes dem Absorptionsspektrum des zu bestimmenden Stoffes angepasst werden. So kann z. B. das Chromat-Ion im 10^{-3} -mg-Bereich im Diphenyloxazol-Fluoreszenzlicht analysiert werden, währenddem für das Permanganat-Ion das Fluoreszenzlicht des Zinksulfids gut geeignet ist und eine genaue Bestimmung im 10^{-4} -mg-Bereich ermöglicht. Da bei einer Vertauschung der Quellen eine scharfe Änderung der respektiven Extinktionskoeffizienten beider Komponenten auftritt, wird die prinzipielle Möglichkeit der gleichzeitigen Bestimmung dieser Stoffe in einem Gemisch gegeben.

Eine wesentliche Eigentümlichkeit der drei beschriebenen Techniken gegenüber den herkömmlichen Methoden, von denen sie abgeleitet sind, besteht darin, dass die Photonen nicht in einem gleichmässigen, kontinuierlichen Fluss auftreten, sondern stossartig als Szintillationen emittiert werden. Es ergibt sich daraus die Möglichkeit, die Vorzüge der Koinzidenzmessungen und der Impulshöhenspektrometrie auszunutzen. Insbesondere

erlaubt letztere, eine Wahl zwischen der Nachweisempfindlichkeit und der Ausdehnung des Messbereiches zu treffen, und gestattet ausserdem, den Verlauf der Eichkurven günstig zu beeinflussen. Alle drei Techniken liefern Impulse, die im gleichen Amplitudenbereich wie bei der Messung eines weichen bis sehr weichen β -Strahlers in einer herkömmlichen Szintillatorlösung liegen.

In methodologischer Hinsicht handelt es sich bei allen drei Techniken um radioszintimetrische Methoden. Die erste beruht auf der Messung der chemischen Fluoreszenzlösung in Lösung. Die zweite kann als Absorptionsphotometrie in Čerenkov-Licht, die dritte als Absorptionsphotometrie in Radiofluoreszenzlicht bezeichnet werden.

Summary. Three techniques are described which allow a quantitative chemical determination of non-radioactive substances by the means of a liquid scintillation counter. The first method is based on the chemical quenching of a radioluminescent solution through the substance that is to be determined. The second method may be described as absorption photometry in Čerenkov-light and the third one as absorption photometry in radiofluorescence light.

P. JORDAN und P. KÖBERLE

*Organisch-chemisches Laboratorium,
Eidgenössische Technische Hochschule,
Zürich (Schweiz), 31. Oktober 1968.*

Delafield's Hematoxylin - Fast Green Mixture for Bulk Staining of Plant Materials

Staining plant materials before they are embedded in paraffin for microtome sectioning has the advantage of skipping the tedious procedure of hydration, staining and dehydration through graded series of alcohol¹. For counterstaining, the material can be first stained with a nuclear stain, dehydrated, embedded, sectioned and the sections later counterstained with the desired cytoplasmic stain dissolved either in alcohol² or clove oil³ (thereby avoiding alcohol totally). Double staining of plant materials in bulk before paraffin embedding to achieve differentiation in 2 colours is also possible⁴. Attempts have been made to use a mixture of Delafield's hematoxylin and fast green – a nuclear and a cytoplasmic stain – to see if specific staining is possible in bulk and the results are presented here.

Staining procedure. (1) Fixed material; stain with Delafield's hematoxylin (ready-to-use solution, British Drug House) 1 part and 0.5% aqueous solution of fast green, 1 part for 2–4 h. (2) Carry dehydration through graded series of ethanol. (3) Perform paraffin infiltration, embedding, cutting and attaching to slides as usual. (4) Wash with xylene to remove paraffin and mount in balsam.

Unwanted accessory parts of the material should be removed before processing. Soft materials stain earlier than harder ones, and hence the length time in the stain mixture in the specific case must be decided by trial. Delafield's hematoxylin does not overstain, and if the

fast green does so, or if it masks the nuclei, it can easily be removed while the material is dehydrated in the second step of the procedure; fast green comes off while Delafield's hematoxylin does not. The proportion of Delafield's hematoxylin to fast green in the staining mixture may be changed to suit the type of plant material and for obtaining a balanced differentiation in 2 colours. Delafield's hematoxylin stains nuclei while the fast green stains cytoplasm and cell walls. Dilute stains for longer time yield well-stained preparations⁵.

Zusammenfassung. Die Möglichkeit einer Doppelfärbung (Plasma-Kern) von pflanzlichem Material in toto vor dem Einbetten in Paraffin wird beschrieben. Mit dieser Methode wird die mehrmalige Wässerung und Entwässerung vermieden.

A. B. SAPRE

*Maharashtra Association for the Cultivation of Science,
Poona-4 (India), 18 October 1968.*

¹ A. B. SAPRE, *Experientia* 24, 311 (1968).

² R. J. TOLBERT, *Stain Technol.* 37, 165 (1962).

³ A. B. SAPRE, *New Phytol.*, in press.

⁴ A. B. SAPRE, *Stain Technol.* 43, 75 (1968).

⁵ I am grateful to Dr. G. B. DEODIKAR, Director, M.A.C.S., for facilities and interest.