

Tyrosin⁸ und von Tryptophan²⁴ in der Peptidkette zu erwarten, da diese Verbindungen eine deutliche Absorption im Bereich von 260 m μ aufweisen.

Bei der Messung von DNP-Prolin in Essigester findet man infolge der Polarisation der Nitrogruppen durch Protonen von der freien Carboxylgruppe, anders als bei *N*-Dimethyl-2,4-dinitroanilin, auch ein Maximum bei 250 m μ , ebenso wie in Eisessig (Abb. 7 und 8). Bei DNP-Prolylpeptiden nimmt der polarisierende Einfluß der sauren Gruppe auf die Nitrogruppen infolge der größeren Entfernung etwas ab, so daß auch in Essigester nur mehr sehr niedrige Maxima bei 250 m μ gemessen werden (Abb. 7). Die Ergebnisse sind in diesen Fällen jedoch nicht eindeutig.

Die Messungen an den verschiedenen Dinitrophenylamino-Derivaten ergeben aber außerdem deut-

²⁴ E. R. Holiday, Biochem. J. 30, 1803 [1936].

lich, daß auch die Absorption der chromophoren Gruppe bei 350—360 m μ keineswegs konstant ist (vgl. Tab. 1). Sie hängt vielmehr stark vom Lösungsmittel, aber auch von den Substituenten an der Aminogruppe ab, was bei quantitativen Messungen die auf der Absorption des Dinitrophenylkerns beruhen, zu berücksichtigen ist.

Sämtliche in dieser Arbeit verwendeten Peptide wurden uns von Herrn Dipl.-Chem. E. Wünsch freundlicherweise zur Verfügung gestellt, wofür wir ihm an dieser Stelle unseren herzlichsten Dank aussprechen möchten.

Die UV-Spektren wurden mit dem Spektralphotometer mit Monochromator M 4 Q der Firma Carl Zeiss aufgenommen.

Herrn Prof. Dr. W. Graßmann danken wir für zahlreiche Anregungen und Diskussionen zu dieser Arbeit. Der Deutschen Forschungsgemeinschaft sind wir für die gewährte Unterstützung sehr dankbar.

Eine Routinemethode zur Bestimmung des Osmiumgehaltes biologischer Präparate

Von G. F. BAHR

Aus dem Institut für Zellforschung und Genetik, Karolinska Institutet, Stockholm

(Z. Naturforsch. 10 b, 156—158 [1955]; eingegangen am 1. Dezember 1954)

Das Os-haltige Objekt wird mit NaOH verseift und mit NaNO₃ oxydiert. Das resultierende Natriumosmiat wird durch H₂SO₄—K₂Cr₂O₇ zersetzt und das entstehende OsO₄ in HCl-Thioharnstoff aufgefangen. Die rote Thioharnstoff-Os-Cl-Verbindung wird kolorimetriert.

Durch die hervorragenden Fixierungseigenschaften des Osmiumtetroxydes für die elektromikroskopische Histologie ist die Frage nach dem Verhalten dieser Substanz gegenüber biologischem Material erneut aktualisiert worden, die der begrenzten Anwendungsmöglichkeiten in der klassischen Histologie wegen nur unbefriedigend bearbeitet worden war^{1, 2}. Um sich eine Auffassung von der Osmium-Aufnahme verschiedener Gewebe in verschiedenen Zeiten und unter veränderten Bedingungen zu verschaffen, wurde es nötig, größere Serienanalysen des Osmiumgehaltes der betreffenden fixierten biologischen Objekte vorzunehmen. Die in der Literatur angegebenen Verfahren erwiesen sich als umständlich und arbeiteten in den meisten Fällen mit größeren Mengen. Wegen der Leichtflüchtigkeit des OsO₄,

das in fast allen Fällen im Reaktionsgang als Zwischenprodukt auftritt, wird den neueren Angaben nach nur noch naß gearbeitet. Die von uns geprüften Titrationsmethoden mit Hilfe von Jodometrie und Permanganatometrie^{3—5} sind durch die Schwierigkeit, den Endpunkt der Titration zu bestimmen, sehr zeitraubend und unsicher. Daher erschien ein kolorimetrisches Vorgehen unter Einschluß der von Chugae⁶ entdeckten Farbreaktion des OsO₄ mit Thioharnstoff in salzsaurer Lösung geeignet. Diese Reaktion ist sehr empfindlich und hat hohe Spezifität.

In Abb. 1 ist der allgemeine Verlauf der Absorptionskurve des Farbkomplexes wiedergegeben, wie er mit einem Beckman-Spektrophotometer gemessen wurde. Das ausgeprägte Maximum bei

¹ G. F. Bahr, Exp. Cell Res. 7, 457 [1954].

² G. F. Bahr, Naturwissenschaften 41, 187 [1954].

³ E. A. Klobbie, Versl. Akad. Amsterdam 6, 551 [1898].

⁴ R. Criegee, Liebigs Ann. Chem. 522, 85 [1936].

⁵ O. Ruff u. F. Bornemann, Z. anorg. Chem. 65, 429 [1910].

⁶ L. A. Chugae, Z. anorg. allg. Chem. 148, 65 [1925].

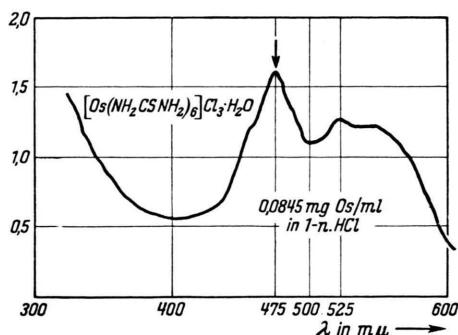


Abb. 1. Verlauf der Absorptionskurve der Thioharnstoff-Osmium-Chloroverbindung. 0,0845 mg Os/ccm in 1-n. HCl.

475—480 m μ und ein kleineres Maximum bei 525 m μ sind signifikant. Zur kolorimetrischen Analyse wurde die Wellenlänge 478 m μ gewählt.

Gang der Analyse

In einem kleinen Silber- oder Quarztiegel (25 ccm) wird das osmium-haltige Präparat mit 2 Teilen fester NaOH über kleiner Flamme verseift und durch portionsweise Zusatz von NaNO₃ eine klare, ruhige, rubinrote Schmelze erzeugt. Der erkaltete Tiegelinhalt löst sich leicht in warmem Wasser. In einem 250 ccm fassenden 3-tubulierten Kolben ist der mittlere Tubus mit einem eingeschliffenen, verschließbaren Tropfrichter versehen. In den schräg ansetzenden Seitentubus wird ein 15 cm aufsteigendes Rohr mit Schliff eingesetzt, das in eine 20 cm nach unten abgebogene Kapillare ausläuft. Durch den anderen, ebenfalls schräg ansetzenden Seitentubus geht ein eingeschliffenes Rohr bis nahe an den Boden des Kolvbens. Das äußere Ende des Rohres ist nach unten umgebogen und wird mittels Stopfen in einem größeren Auffanggefäß (A) festgehalten. An A kann sowohl Sog als auch Druck gelegt werden. Über die Kapillare schiebt man ein 30 ccm fassendes Reagenzglas, in das 5 ccm einer 4-proz. Lösung von Schwefelharnstoff in 6-n. HCl vorgelegt werden. Das Reagenzglas wird von einem größeren Becherglas umgeben, in den man entweder Eisstückchen füllt oder, bei einer größeren Zahl von Analysen, Leitungswasser laufen läßt, das von einem darunter befindlichen größeren Trichter aufgefangen wird. Dann gibt man nacheinander 5 ccm des gelösten Tiegelinhaltens und 5 ccm einer kalt gesättigten Lösung von Aminosulfonsäure durch den Trichter. Wenn die Entwicklung von Gasblasen (N₂) schwach geworden ist, gibt man 10 ccm einer 1:1 verdünnten H₂SO₄, die mit K₂Cr₂O₇ gesättigt ist, durch den Trichter und verschließt. Der Kolbeninhalt wird jetzt etwa 20 min mit kleiner Flamme im Kochen gehalten, während gleichzeitig ein mäßiger Gasstrom (CO₂, N₂, O₂ oder Luft) durch die Apparatur geleitet wird, bis die Flüssigkeitsmenge im Reagenzglas die vorher markierte Menge von 20 ccm erreicht hat. Alles Os ist jetzt in das Reagenzglas übergegangen und hat, je nach der Os-Menge, eine rosa- bis

tiefrote Farbe entwickelt. Der Inhalt des Reagenzglases wird nun mit dest. Wasser auf 30 ccm aufgefüllt und kolorimetriert. Der für das betreffende ε aus der Referenzkurve entnommene Os-Wert wird 5-mal mit der Anzahl ccm Lösung des Tiegelinhaltens multipliziert, um den totalen Gehalt des Präparates an Os zu berechnen. Legt man Sog an das Auffanggefäß A, so kann die Apparatur leicht geleert und durch den Trichter mit Wasser gespült werden. Darauf kann sofort die nächste Probe analysiert werden.

Es ist zu beachten, daß bei der Verdünnung des Destillates die Salzsäure-Normalität den Wert 0,3 nicht wesentlich unterschreiten sollte, da sonst die Farbe irreversibel von Rot in Braun umschlägt. Das ist auch der Fall, wenn größere Mengen Os in der Probe enthalten sind, als von der vorgelegten Salzsäure-Thioharnstoff-Lösung aufgenommen werden können. Ist die Farbe nach Braun umgeschlagen, so kann die salzaure Lösung ohne weiteres noch einmal von Kaliumbichromat-Schwefelsäure in eine vermehrte Vorlage abdestilliert werden. Für annähernd bekannte Os-Mengen können 3 mg Thioharnstoff auf jedes mg Os berechnet werden.

Das Referenzsystem

Es zeigte sich, daß ein Referenzsystem nicht durch Auflösen von OsO₄ in 6-n. HCl-Thioharnstoff-Lösung herzustellen war. Zwar entwickelt sich eine kräftige Farbe; verdünnt man aber unter Beibehaltung einer bestimmten HCl-Normalität, so gehorcht die Verdünnungskurve (Abb. 2) nicht dem Beerschen Gesetz. Der Extinktionskoeffizient nimmt mit steigender Verdünnung zu. Bei sehr hohen Verdünnungsgraden jedoch fällt die Kurve mit einer durch Destillation des OsO₄ gewonnenen zusammen, d. h. löst man dagegen abgewogene Mengen OsO₄ in 30-proz. NaOH und destilliert wie im Analysengang beschrieben von Schwefelsäure-Kaliumbichromat ab, so liegen die Extinktionswerte auf einer Geraden ($\pm 1\%$) (Abb. 2). Die so gewonnene Kurve wurde verwendet, um die unbekannten Os-Werte abzulesen. Durch die große Empfindlichkeit der Farbreaktion können noch 1 γ Os/ml gut analysiert werden, was etwa 0,5 mg im Ausgangsmaterial entspricht.

Das beschriebene Verfahren vermeidet die Anwendung von konz. HNO₃ zur Freisetzung des OsO₄, die überdestilliert den Thioharnstoff zerstört und durch entwickelte Stickoxyde niedrige Os-Werte verursacht⁷. Durch den Oxydationsprozeß mit NaNO₃ in alkal. Schmelze entsteht Nitrit, womit, je nach der Menge des entstandenen Nitrits, Stickoxyde in das Destillat übergehen können, um ebenfalls niedrige Os-Werte zu verursachen. Durch Zugabe

⁷ E. B. Sandell, Ind. Engng. Chem., analyt. Edit. 16, 342 [1944].

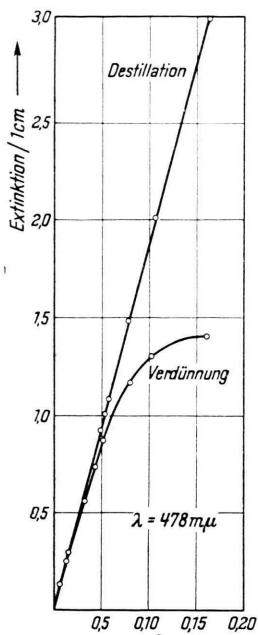


Abb. 2

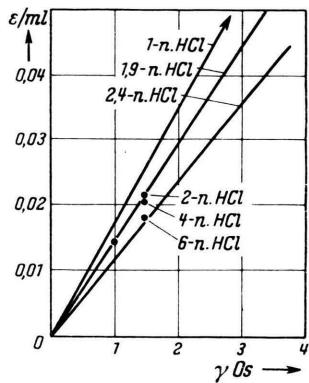


Abb. 3

Abb. 2. Verhalten der Extinktion der Thioharnstoff-Osmium-Chlorverbindung zur Konzentration in 1-n. HCl bei der Wellenlänge 478 m μ : Nach Destillation des OsO₄ und nach Auflösen des OsO₄ in 1-n. HCl + 4% Thioharnstoff und Verdünnung mit 1-n. HCl.

Abb. 3. Die Extinktions-Konzentrationswerte Sandells⁷ erzielt durch Behandeln verschiedener Mengen OsO₄ mit Thioharnstoff-Salzsäure und einzelne Werte zum Effekt der HCl-Konzentration⁷. Die für vorliegende Untersuchung erzielte Kurve ist als Pfeil eingetragen.

von gesättigter Aminosulfonsäurelösung wird das Nitrit in wenigen Augenblicken unter Entwicklung von N₂ zersetzt.

Die Thioharnstoff-Osmium-Farbreaktion Chugaevs ist schon früher in dem Verfahren von Sandell⁷ verwendet worden. Den von Sandell angegebenen Kurven scheinen im Vergleich mit unseren Werten jedoch zu niedrige Absorptionskoeffizienten zugrunde zu liegen (Abb. 3). Treten nämlich bei der Aufstellung des Referenzsystems Os-Verluste auf, oder es kommt, wie im Falle der Verdünnungskurve, zu Abweichungen vom Beerschen Gesetz, so werden durch die resultierende Lage der Kurve (zu niedriges ε /Gewicht Os) später zu hohe Os-Werte abgelesen. Das kann bei günstiger Fehlergröße seinerseits die Verluste bei der Analyse der unbekannten Proben kompensieren, und so bei wenig variierenden Os-Mengen unentdeckt bleiben. Wechselt der Os-Gehalt der Proben sehr, so werden die Fehler jedoch beträchtlich.

Das von Dwyer und Gibson angegebene Verfahren⁸ fordert etwa 4 mg Os im Ausgangsmaterial, erwies sich aber auch durch die heftigen Reaktionen des verwendeten Na₂O₂ mit den Gewebestücken bei der Oxydation als für unsere Zwecke ungeeignet.

In analoger Weise können die gesammelten Os-Rückstände eines Jahres z. B., die bei intensiver elektronenmikroskopischer Arbeit beträchtlich sein können, aufgearbeitet werden. An Stelle der HCl-Vorlage verwendeten wir ein eingeschliffenes Rohr, das erlaubt, den OsO₄-Gasstrom über P₂O₅ zu leiten und in einem weiteren angeschliffenen Gefäß, das von fester Kohlensäure-Aceton-Mischung gekühlt wurde, OsO₄ in langen, durchsichtigen Nadeln zurückzugewinnen.

⁸ F. P. Dwyer u. N. A. Gibson, Analyst 76, 104 [1951].

Blattstecklinge als Indikatoren für blütenbildende Substanzen *

Von FRIEDRICH OEHLKERS

Aus dem Botanischen Institut der Universität Freiburg i. Br.

(Z. Naturforsch. 10 b, 158—160 [1955]; eingegangen am 7. Januar 1955)

Herrn Professor A. Kühn zum 70. Geburtstage gewidmet

Blattstecklinge blühreifer unifoliater Streptocarpus-Arten entwickeln als Restitutions-sprosse entweder nichtblühende vegetative Pflanzen oder sehr bald blühende Pflanzen, oder endlich direkt Infloreszenzen. Die Verteilung gruppirt sich in derselben Reihenfolge von außen nach dem Infloreszenzansatz hin, läßt also auf eine Zunahme der blütenbildenden Substanzen schließen.

Julius Sachs¹ berichtet (1893, S. 1170), daß Blätter von blühreifen Begonien, als Stecklinge ausgelegt, an ihren Restitutionssprossen in den Achseln

der ersten Blätter sofort Infloreszenzen anlegen. Stecklinge dagegen von Blättern noch nicht blühreifer Pflanzen bringen allein vegetativ wachsende

* Die Arbeiten wurden mit Hilfe der Deutschen Forschungsgemeinschaft ausgeführt.

¹ J. Sachs, Gesammelte Abhandlungen über Pflanzenphysiologie Bd. II, Leipzig 1893.