

F. Gstirner, D. Kottenberg und A. Maas

Die Gelstruktur der wasserhaltigen emulgierenden Salbe

Aus dem Pharmazeutischen Institut und dem Institut für Cytologie und Mikromorphologie der Universität Bonn

(Eingegangen am 11. Juli 1968)

Die wasserhaltige emulgierende Salbe (etwa 70% H₂O) des 3. Nachtrages zum DAB 6 bzw. des DAB 7 und ihre Ausgangsbestandteile wurden elektronenmikroskopisch untersucht. Mittels einer neuen modifizierten Gefrierätzungsmethode konnte das hypothetische Gelgerüst der plastischen wasserhaltigen emulgierenden Salbe elektronenmikroskopisch nachgewiesen und durch Stereoaufnahmen in seinem dreidimensionalen Feinbau analysiert werden.

Gel-structure of the Hydrous Emulsifying Ointment

The hydrous emulsifying ointment (about 70% H₂O) of the 3rd appendix to DAB 6 or DAB 7 and its ingredients were examined by electron microscopy. Using a new modified method of freeze-etching it was possible to recognize the hypothetical gel-structure of the plastic hydrous emulsifying ointment and to analyse its three-dimensional micromorphology.

In den 3. Nachtrag zum DAB 6 wurde die wasserhaltige emulgierende Salbe aufgenommen, die auch für das DAB 7 vorgesehen ist*) und vorher als Lanette-Salbe im Gebrauch stand. Sie stellt eine Öl-in-Wasser-Emulsionssalbe dar, indem die lipophile Phase (Vaseline, Paraffinöl) in Wasser als äußere Phase dispergiert ist. Sie wird in 3 Stufen hergestellt:

1. Emulgierender Cetylstearylalkohol (Komplexemulgator):

Cetylstearylalkohol	90 T.
Cetylstearylschwefelsaures Natrium	10 T.

2. Emulgierende Salbe:

Emulgierender Cetylstearylalkohol	30 T.
Dickflüssiges Paraffin	35 T.
Weißes Vaseline	35 T.

1. und 2. werden auf dem Wasserbad zusammengeschmolzen.

3. Wasserhaltige emulgierende Salbe:

Emulgierende Salbe	300 T.
Wasser	699 T.
p-Hydroxybenzoesäuremethylester	0,6 T.
p-Hydroxybenzoesäurepropylester	0,4 T.

Die Hydroxybenzoesäureester werden im Wasser unter Erhitzen gelöst. Die emulgierende Salbe wird auf dem Wasserbad bei etwa 70° geschmolzen und mit der auf etwa gleiche Temperatur abgekühlten, wäßrigen Lösung der p-Hydroxybenzoesäureester unter Umrühren in kleinen Anteilen versetzt. Die Salbe wird bis zum Erkalten gerührt und das verdampfte Wasser ersetzt.

*) Als wasserhaltige hydrophile Salbe inzwischen in das DAB 7 aufgenommen.

Öl-in-Wasser-Emulsionen mit der äußeren wäßrigen Phase sind im allgemeinen Flüssigkeiten, während die wasserhaltige emulgierende Salbe plastisch ist und eine streichbare Salbe darstellt. Sie enthält nicht, wie andere Öl-in-Wasser-Emulsionen, einen einfachen Öl-in-Wasser-Emulgator, sondern einen Komplexemulgator, der zur Hydrogelbildung befähigt ist und zu einer plastischen Masse führt.

Komplexemulgatoren setzen sich aus einem Öl-in-Wasser-Emulgator und einem schwachen Wasser-in-Öl-Emulgator zusammen, über deren Bildung zahlreiche Arbeiten erschienen sind, die die Komplexbildung von theoretischer, kolloid-chemischer und biochemischer Seite an Modellen untersuchen¹⁾. Die Arbeiten gehen auf *E. Schulman* zurück, die von *K. Münzel* auf die wasserhaltige emulgierende Salbe ausgeweitet wurden²⁾. *Münzel* machte auch auf die Hydrogelbildung derartiger Salben aufmerksam, die vor ihm schon von einigen Autoren beobachtet worden war³⁾.

In Anlehnung an die Stearat-Salbe kommt die Hydrogelbildung der wasserhaltigen emulgierenden Salbe nach *Münzel* etwa in folgender Weise zustande: Der Öl-in-Wasser-Emulgator (Seife, Natriumcetylstearylsulfat) bildet in heißer wäßriger Lösung in größerer Konzentration Mizellen, die von kugelartigen über rollenformige in plattenähnliche, laminare Mizellen übergehen. Beim Erkalten vernetzen sich die Mizellen durch Nebenvalenzen an Haftpunkten zu einer dreidimensionalen Struktur, einem kohärenten Gelgerüst, das, von Wasser erfüllt, ein Hydrogel bildet. Der im Überschuß vorhandene schwache Wasser-in-Öl-Emulgator (Stearinsäure, Cetylstearylalkohol) wird in die äußeren Schichten der Mizellen eingelagert, indem die Moleküle sich parallel zu den Molekülen des Öl-in-Wasser-Emulgators orientieren: die hydrophilen bzw. lipophilen Gruppen stehen parallel und sind durch Nebenvalenzen aneinander gebunden. Durch diese polarisierte Einlagerung des überschüssigen Wasser-in-Öl-Emulgators werden die Mizellen derart verstärkt, daß die Viskosität sich erhöht und eine streichfähige Salbe entsteht. Außerdem bilden beide Emulgatoren einen zusammengesetzten Film um die dispergierte ölige Phase, da das Vaseline bei höherer Temperatur geschmolzen ist, der zu einer Öl-in-Wasser-Emulsion führt.

Die Hydrogelbildung der Komplexemulgatoren läßt sich sowohl aus dem Verhalten der Fett-in-Wasser-Emulsionssalbe fordern als auch theoretisch annehmen. Ein endgültiger Beweis dafür durch Sichtbarmachung des Gelgerüsts wurde bisher

¹⁾ Übersicht mit zahlreichen Literaturangaben: *H. Loth*, Dtsch. Apotheker-Ztg. 107, 1527 (1967). Neuere Arbeiten: *Lange und Mahl*: Seifen, Fette, Anstrichmittel 66, 774 (1964); *F. A. J. Talman*, *P. J. Davies* und *E. M. Rowan*, J. Pharmacy Pharmacol. 19, 417 (1967); *B. W. Barry* und *E. Shotton*, J. Pharmacy Pharmacol. 19, Suppl. 110, 121 (1967).

²⁾ *K. Münzel* und *R. Ammann*, Pharm. Acta Helvetiae 29, 91, 171 (1954). Siehe auch *F. Gstirner* und *A. Bleß*, Mitt. dtsh. pharmaz. Ges. 32, 197 (1962). *Z. Gruntová*, *L. Zathurecký* und *G. Somoskeöy*, Cs. Farm. 9, 217, 282 (1960).

³⁾ *Lawrence*, Trans. Faraday Soc. 33, 325 (1937); *Martin* und *Hermann*, Trans. Faraday Soc. 37, 25 (1941).

noch nicht erbracht. Da sich die Gelgerüststruktur im kolloid- und angeström-dispersen Bereich aufbaut, ist sie im Lichtmikroskop nicht sichtbar.

Im Laufe der letzten 20 Jahre wurde öfters versucht, Gelgerüste in verschiedenen Systemen zu klären oder sichtbar zu machen. *U. Hoffmann*⁴⁾ forderte eine „Kartenhausstruktur“, die *S. Peter*⁵⁾ nachweisen konnte, indem das elektrische Leitvermögen einer Graphithydropaste gleichmäßig mit dem Erstarren anstieg. *A. Weiss, R. Fahn* und *U. Hoffmann*⁶⁾ schlossen aus der Isolation des flüssigkeitsfreien Gelgerüsts nach Gefrier-trocknung eines thixotropen Geles ebenfalls auf eine Gerüststruktur des flüssigen Geles. Da *F. Patat* und *J. Hartmann*⁷⁾ aus Salzlösungen nach Gefriertrocknung ebenfalls ein Gerüst isolieren konnten, verlor der Schluß von *A. Weiss* und Mitarb. an Beweiskraft. *W. Völksen*⁸⁾ versuchte ein Gelgerüst in Zinkoxid-Suspensionen im Elektronenmikroskop nachzuweisen. *W. Theimer*⁹⁾ gelang es, das Gelgerüst eines Gelatinegels elektronenoptisch sichtbar zu machen und damit nachzuweisen. *F. Gstirner* und *H. J. Bodenbach*¹⁰⁾ konnten in einer Erdnußöl-Aerosil-Salbe das Gelgerüst des Aerosils elektronenoptisch zur Anschauung bringen.

Es wurde daher versucht, in der wasserhaltigen emulgierenden Salbe das hypo-thetische Gelgerüst elektronenoptisch zu erfassen.

Die mit einem Durchstrahlungs-Elektronenmikroskop durchgeführte Unter-suchung erforderte eine vorangehende Präparation, um das Objekt den besonderen Bedingungen der Elektronenmikroskopie (Hochvakuum, Erwärmung und andere Folgen der Elektroneneinwirkung) anzupassen und die Voraussetzungen für die elektronenoptische Abbildung (ausreichender Elektronenstreukontrast, durchstrahl-bare Schichtdicke von wenigen 100 Å) zu erfüllen.

Da es sich bei der wasserhaltigen emulgierenden Salbe um ein in physikalischer und chemischer Hinsicht sehr empfindliches Objekt handelt, mußte in besonderem Maße darauf geachtet werden, bei der Präparation eine Veränderung der ursprüng-lichen Objektmikromorphologie zu vermeiden.

Zur Präparation bot sich zunächst die zur Untersuchung organischer Objekte gebräuchliche Ultradünnschnitt-Technik an, welche im wesentlichen aus einer chemischen Fixierung und Kontrastierung mit anschließendem stufenweisem Ent-zug des Wassers, einer Einbettung in einen Kunststoff und einer Anfertigung elektronenmikroskopisch durchstrahlbarer Ultradünnschnitte besteht. Wie sich je-doch zeigte, war eine Fixation und Kontrastierung der vorliegenden Salbe mittels des dafür meist gebräuchlichen Osmiumtetroxids nicht möglich.

Es wurde daher versucht, auf andere Weise eine möglichst schonende Fixierung, Kontrastierung und Entwässerung der Salbe durchzuführen. Hierzu wurde die von *Moore* und *Mühletaler*¹¹⁾ entwickelte „Gefrierätzmethode“ zu einer für die Unter-

4) Kolloid. Z. 110, 1 (1945).

5) Kolloid. Z. 113, 29 (1949).

6) Naturwissenschaften 39, 351 (1952).

7) Angew. Chem. 69, 197 (1957).

8) Die Krankenhausapotheke 6, 15 (1956).

9) Z. Naturforsch. 15b, 346 (1960).

10) Pharmac. Acta Helvetiae 38, 235 (1963).

11) Ztschr. f. Zellforschung 62, 546 (1964).

suchung des vorliegenden Objektes speziell geeigneten Präparationsmethode erweitert. Die klassische Gefrierätzmethode besteht im wesentlichen aus folgenden Präparationschritten: 1. Einfrieren des Objektes bis auf etwa -140° , 2. Temperaturerhöhung des gesamten Objektes auf etwa -100° , wobei das im Objekt als Eis vorhandene Wasser sublimiert und die Objektoberfläche eine „Ätzstruktur“ erhält, 3. Herstellung eines elektronenmikroskopischen Abdruckpräparates der gefriergeätzten Objektoberfläche.

Gegenüber der chemischen Fixierung, Kontrastierung und Entwässerung handelt es sich hier im Prinzip um eine rein physikalisch wirksame Methode. Diese klassische Gefrierätzmethode war wegen der besonderen Empfindlichkeit des vorliegenden Untersuchungsobjektes jedoch in dieser Form nicht geeignet. Beim Einfriervorgang kann bekanntlich eine zu kleine Einfriergeschwindigkeit zu einem Wachstum großer Eiskristalle führen, wobei erhebliche morphologische Veränderungen des Objektes auftreten können. Um dies zu verhindern, werden i. a. bei der Untersuchung biologischer Objekte chemische Gefrierschutzmittel angewandt. Hierauf sollte jedoch bei der vorliegenden Untersuchung verzichtet werden, um jede mögliche chemische Beeinflussung des empfindlichen Objektsystems auszuschließen. Es blieb somit nur die Möglichkeit, eine Bildung großer Eiskristalle durch eine Erhöhung der Einfriergeschwindigkeit auf einen Wert weit über $100^{\circ}/\text{Sek.}$ zu vermeiden, was durch eine spezielle Versuchsanordnung erreicht werden konnte.

Eine weitere Schwierigkeit lag bei der Präparation darin, daß auch beim Sublimationsvorgang bei empfindlichen Objekten unkontrollierbare morphologische Veränderungen infolge örtlich unterschiedlicher Sublimationsbedingungen zu erwarten sind. Während bei der klassischen Gefrierätzmethode das gesamte Objekt auf die Sublimationstemperatur von etwa -100° gebracht wird, wurde bei der entwickelten neuen Methode das Objekt auf der (sublimationsfernen) Einfriertemperatur von -140° belassen und lediglich die Oberfläche des Objektes durch eine regelbare Wärmestrahlungsquelle auf die Sublimationstemperatur von -100° gebracht. Hierdurch wurde eine partielle Sublimation aus tieferen Objektschichten und eine dadurch mögliche unerwünschte Objektveränderung weitgehend ausgeschlossen. Mittels einer schrittweise oder kontinuierlich bewegten Blende konnte eine stufenweise oder kontinuierlich veränderte „Äztiefe“ auf der Objektoberfläche erzeugt werden, womit eine vergleichende Untersuchung von Objektveränderungen bei der Sublimation ermöglicht wird. Zur Kontrolle und definierten Einstellung des Einfrier- und des Sublimationsvorganges wurde eine synchronlaufende Messung und Registrierung des zeitlichen Verlaufes der Objekttemperatur und des Druckes vorgenommen. Eine nähere Beschreibung der Untersuchungsmethode findet sich am Schluß dieser Arbeit sowie bei *A. Maas*¹²⁾.

¹²⁾ Proceedings Fourth European Regional Conference on Electron Microscopy Rome, 35 (1968).

Da von der wasserhaltigen emulgierenden Salbe gerade das Gelgerüst erhalten werden sollte, wurde von dem eingefrorenen Objekt die äußerste Eisschicht bis zu einer Tiefe von 5000 Å absublimiert und somit das Gelgerüst in der gleichen Tiefe freigelegt. Anschließend erfolgte die Herstellung eines Kohlehüllabdruckes durch Kohlenstoffaufdampfung ohne Unterbrechung des Hochvakuums. Durch die Kohlehüllbedampfung konnte die recht komplizierte Gelgerüstmorphologie vollständig stabilisiert werden, wobei ein elektronenmikroskopisches Auflösungsvermögen der Präparate von etwa 100 Å erreicht wurde.

Die elektronenmikroskopische Untersuchung dieser nach Gefrierätzung erhaltenen Oberflächenhüllabdrücke gestattet mittels der Stereoabbildungstechnik eine direkte vollständige dreidimensionale Analyse des Gelgerüstes.

Um nicht durch die Strukturen der einzelnen Bestandteile der Salbe getäuscht zu werden, wurden elektronenoptische Aufnahmen von folgenden Objekten nach Gefrierfixierung bz. Gefrierätzung gemacht:

1. Natriumcetylstearylsulfat in wäßriger Lösung, 2. Cetylstearylalkohol in wäßriger Suspension, 3. wäßrige Emulsion des emulgierenden Cetylstearylalkohols, 4. emulgierende Salbe, 5. wasserhaltige emulgierende Salbe.

Die Konzentrationen entsprechen denen der wasserhaltigen emulgierenden Salbe. Die elektronenoptischen Aufnahmen stellen, wie bereits erwähnt, die aus einer Eisschicht räumlich herausragende Teile des Gelgerüstes dar.

Abb. 1 (Seite 345) einer 1,3proz. wäßrigen Lösung von Natriumcetylstearylsulfat läßt nur wenige faden- und kornartige Relikte mit einem Durchmesser von 1000—3000 Å erkennen. Vermutlich handelt es sich um größere Molekülaggregate. Einen ähnlichen Befund erzielten *M. Kehren* und *M. Rösch*¹³⁾ mit einer 10^{-3} M Lösung von Natriumdodecylsulfat, allerdings unter anderen Bedingungen.

Abb. 2 (Seite 346) zeigt das Bild einer 11,5proz. Suspension von Cetylstearylalkohol in Wasser mit rundlichen Formen verschiedenster Art und Größe von durchschnittlich 10000 Å.

Auf Abb. 3 (Seite 347) ist eine 10proz. wäßrige Emulsion bzw. Suspension des Komplexemulgators zu sehen. Der Komplexemulgator (1 T. Natriumcetylstearylsulfat + 9 T. Cetylstearylalkohol) wird in heißem Wasser geschmolzen und dispergiert. Nach dem Erkalten entsteht eine plastische streichfähige, salbenartige Masse, der eine Gelstruktur zugrundeliegen muß. Demnach sind auf Abb. 3 deutlich netzartige Strukturen zu erkennen, die auf ein Gelgerüst schließen lassen. Die Strukturen ragen hier mehr oder weniger vollständig als Ringe, Ringsegmente aus der Eisschicht heraus. Vielfach sind von den Netzstrukturen nur Teile als Aststücke zu sehen, die in die verschiedensten Richtungen weisen, da auch ein räumlich in verschiedenster Richtung unregelmäßig ausgebildetes Gelgerüst angenommen werden muß.

¹³⁾ Melliand Textilberichte 38, 1295 (1957).



Abb. 1. Elektronenoptische Aufnahme einer 1,3proz. wäßrigen Lösung von Natrium-cetylstearylsulfat nach Gefriertrocknung. Vergrößerung 1 : 20000. Der Strich auf der Abb. entspricht der Länge 1 Mikron

Archiv 200



Abb. 2. Elektronenoptische Aufnahme einer 11,5proz. wäßrigen Suspension von Cetylstearylalkohol nach Gefriertrocknung. Vergrößerung 1 : 20 000



Abb. 3. Elektronenoptische Aufnahme einer 10proz. wäßrigen Lösung des Komplexemulgators: 1 T. Natriumcetylstearylsulfat + 9 T. Cetylstearylalkohol nach Gefrier-trocknung. Vergrößerung 1 : 20000

Als 4. Objekt wurde die emulgierende Salbe einer elektronenoptischen Untersuchung unterzogen. Sie stellt eine erstarrte Schmelze von Vaseline, Paraffinöl mit dem Komplexemulgator dar. Sie ist also wasserfrei und läßt keine Gelstruktur erwarten. Das elektronenoptische Bild läßt ein regelloses Gewirr von verschiedenen, meist sphärischen, Strukturen erkennen, so daß das Bild hier nicht aufgenommen wurde.

Schließlich wurde die wasserhaltige emulgierende Salbe untersucht, von der wieder eine Gelstruktur erwartet werden muß. Der Oberflächenabdruck zeigt in der Übersicht (Abb. 4, Seite 349) ein Netzwerk ringartiger Struktur, das als Gelgerüst angesprochen werden kann, und mit auffälligen, kugelartigen Partikeln besetzt ist. Diese haben einen durchschnittlichen Durchmesser von 20000 Å und liegen damit im Bereich des Auflösungsvermögens des Lichtmikroskopes. Hier sind sie nach dem Anfärben mit Sudanrot III als die dispergierten Fetteilchen (Paraffinöl und Vaseline) zu identifizieren. Der durchschnittliche Abstand der Partikel beträgt im elektronenmikroskopischen Bild 30000 Å. Die Partikel scheinen sich wieder aus zahlreichen kleineren Gebilden zusammensetzen. Die Lücken des Netzwerkes entsprechen der absublimierten wäßrigen Phase. Aus stereoskopischen Aufnahmen ergab sich, daß das Gerüstwerk etwa 5000 Å aus der Eisoberfläche herausragt.

Abb. 5 (Seite 350) zeigt einen vergrößerten Ausschnitt. Man erkennt darauf, daß das netzförmige Gelgerüst aus geradlinigen Ketten besteht. Diese Ketten werden wiederum aus kugelförmigen Partikeln gebildet mit einem Durchmesser von 750 bis 1500 Å. Die Ketten vernetzen sich und bilden dreidimensionale Maschen von wabenähnlicher Gestalt. Die Länge einer Kette zwischen zwei Verbindungspunkten beträgt im Durchschnitt 10000 Å und setzt sich aus 6 bis 8 kugelförmigen Partikeln zusammen. Abb. 6 (Seite 351) zeigt einen Verbindungspunkt in 100000facher Vergrößerung, auf der die kugelartigen Gebilde noch deutlicher zu erkennen sind.

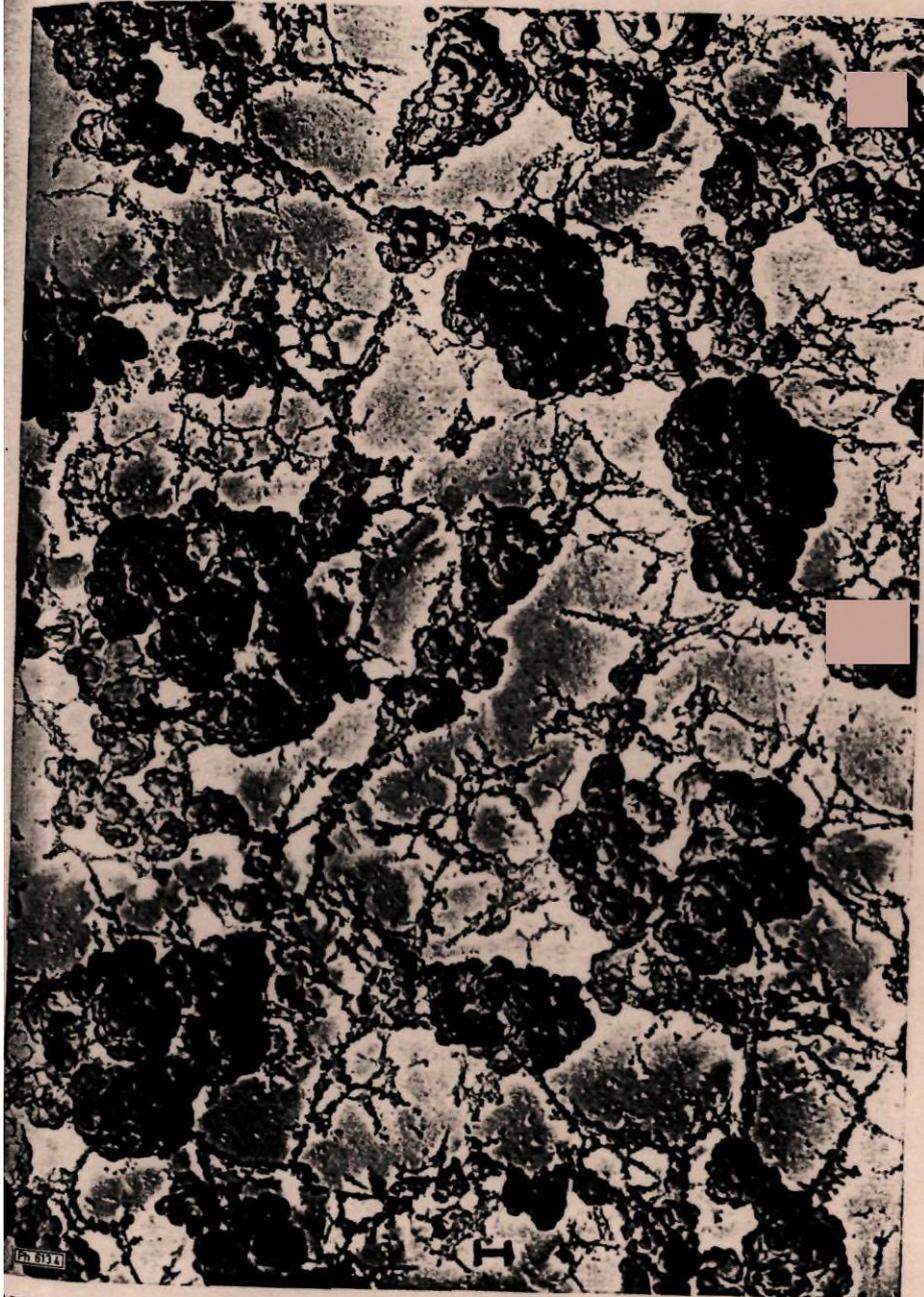


Abb. 4. Elektronenoptische Aufnahme der wasserhaltigen emulgierenden Salbe nach Gefriertrocknung, Übersichtsbild. Vergrößerung 1 : 6500

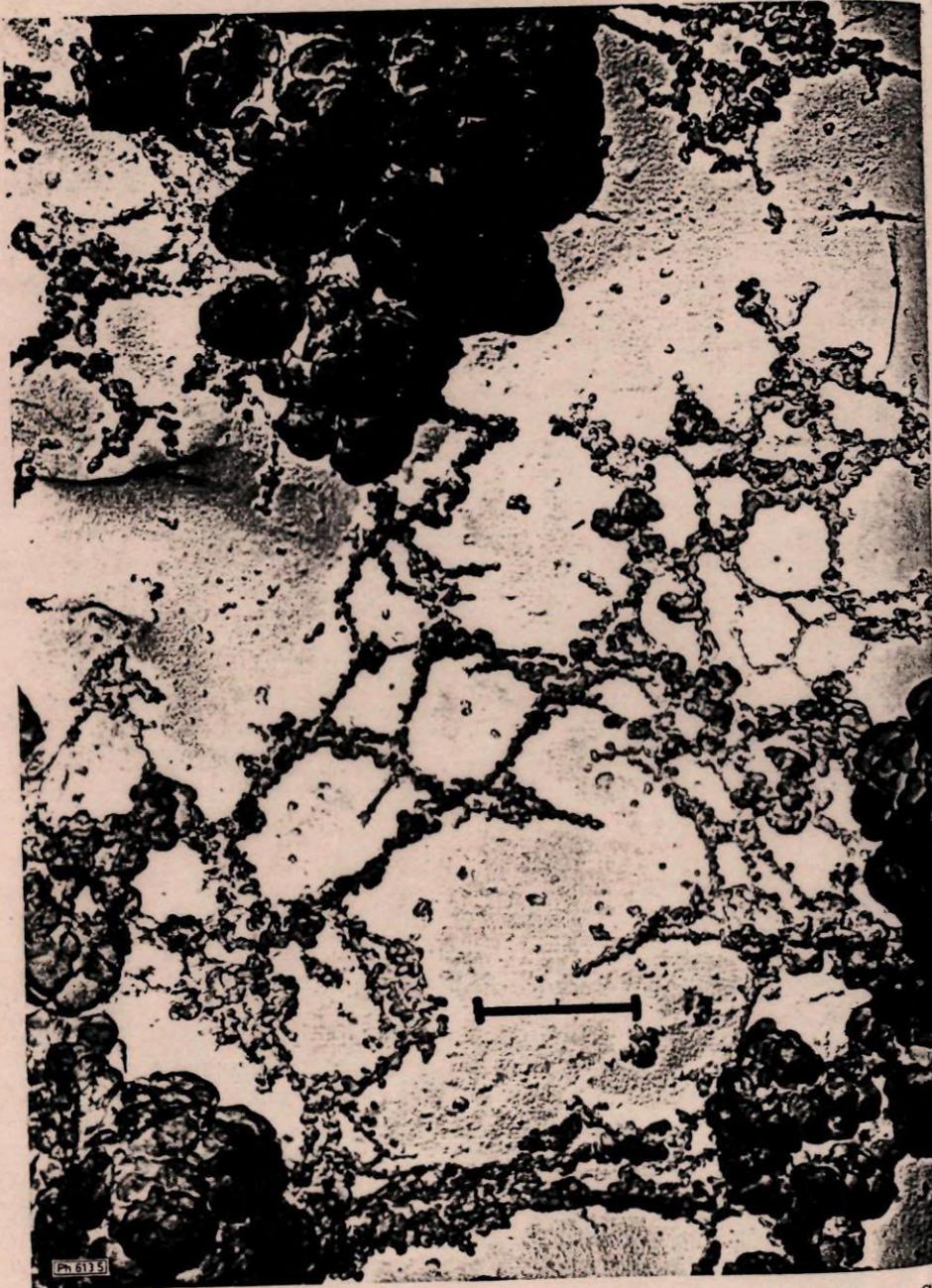


Abb. 5. Elektronenoptische Aufnahme der wasserhaltigen emulgierenden Salbe nach Gefrier-
frietrocknung. Vergrößerung 1 : 20000

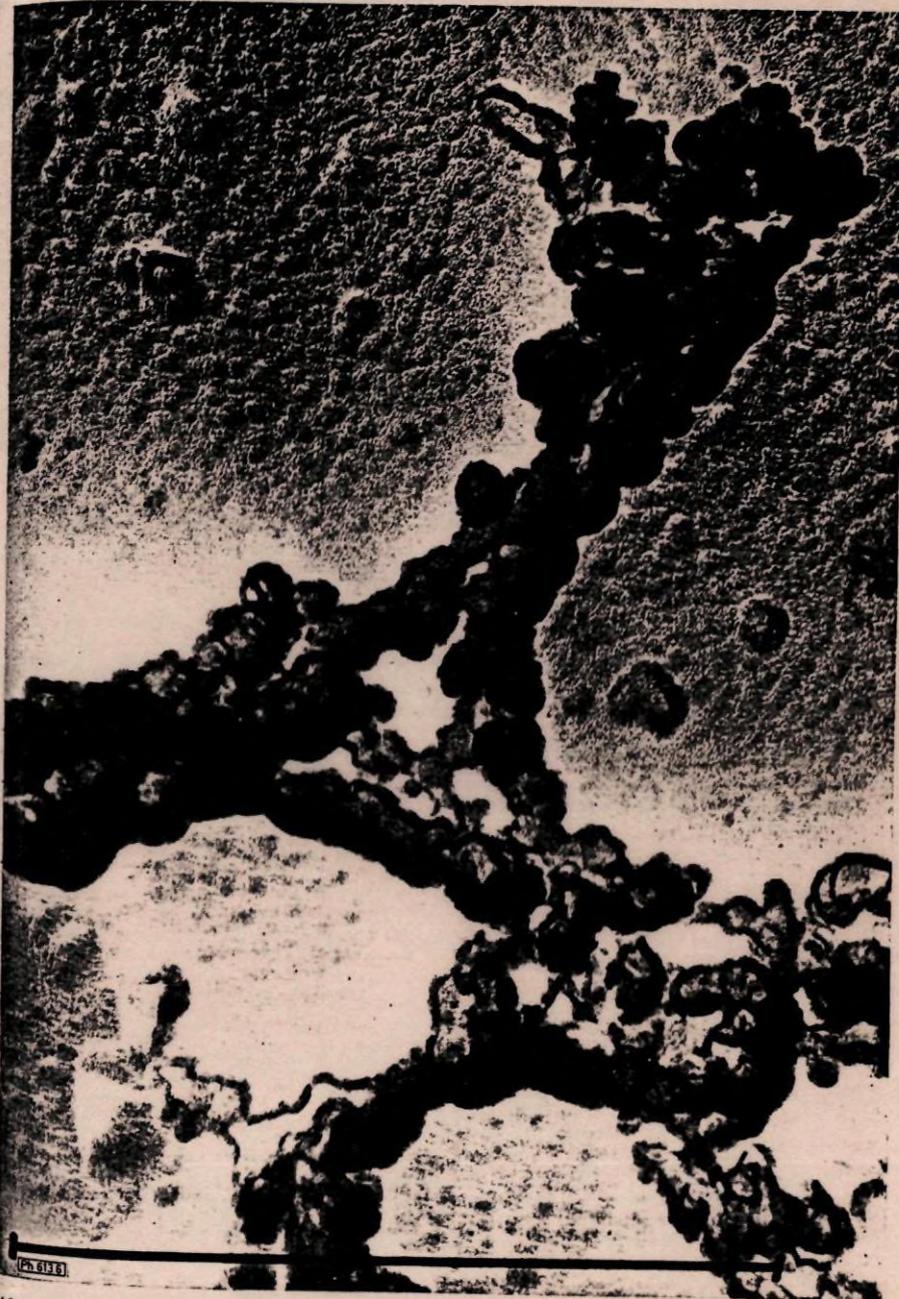


Abb. 6. Elektronenoptische Aufnahme der wasserhaltigen emulgierenden Salbe nach Gefriertrocknung. „Verbindungspunkt“ des Gelgerüsts. Vergrößerung 1:100000

Durch diese elektronenmikroskopischen Aufnahmen dürfte nunmehr die Gelstruktur der wasserhaltigen emulgierenden Salbe und damit auch allgemein ähnlicher wasserhaltiger Salben mit Komplexemulgatoren nachgewiesen sein.

Beschreibung der Versuche

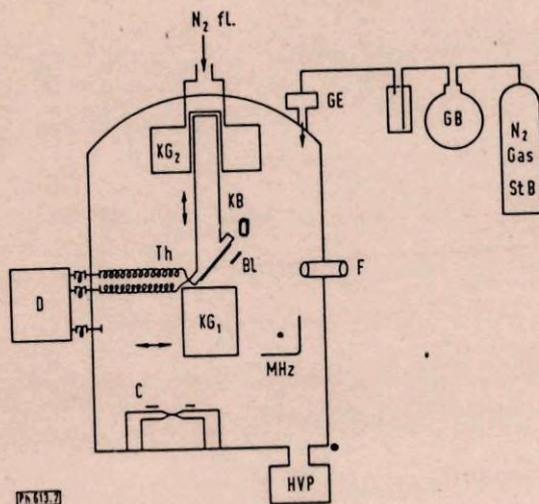


Abb. 7

Apparative Versuchsanordnung

In die Rezipientenglocke einer Hochvakuumanlage (Balzers BA 350) wurde ein Kupferblock (KB) montiert, der zur Befestigung des Präparateobjektträgers (O) dient. Der Kupferblock kann durch Fernbedienung in ein Dewar-Gefäß (KG₁) mit flüssigem Stickstoff eingeführt werden (untere Stellung). Außerdem läßt er sich durch das Kühlgefäß (KG₂) auf die Temperatur des flüssigen Stickstoffes (-195°) abkühlen. Zur Messung der Temperatur dient ein an den Kupferblock montiertes Kupfer-Konstantan-Thermoelement. Die Messung erfolgt mit einem mV-Meter.

In der oberen Stellung des Kupferblockes läßt sich nach Schwenken des Dewar-Gefäßes das Präparat unter einem Winkel von 35° mit einer Kohlenstoffbedampfungsquelle (C) bedampfen. Der Abstand zwischen dieser und dem Präparat beträgt 12,5 cm. Ebenfalls in der oberen Stellung des Kupferblockes ist es möglich, das Präparat mit einer Mikroheizquelle (MHZ) senkrecht zu beheizen. Der Abstand zwischen dieser und dem Präparat beträgt 15 cm. Mittels eines verschiebbaren Blendenschildes (Bl) läßt sich eine Hälfte der Präparatoberfläche wahlweise gegen die Wärmebestrahlung abschirmen.

Über ein Gaseinlaßventil (GE) läßt sich die Rezipientenglocke mit Stickstoffgas füllen. Dieses wurde über konz. Schwefelsäure, Calciumchlorid und Aktivkohle gereinigt und getrocknet. Sowohl die Temperatur des Objektes als auch das Vak. in der Rezipientenglocke konnten mittels einer von Maas entwickelten und konstruierten elektronischen Apparatur auf einem Diagramm (D) während des gesamten Versuches verfolgt werden (Maas¹²).

Präparation der Objekte

Die Objekte (Salben, Salbenbestandteile) wurden 24 Std. der Ruhe überlassen und dann möglichst gleichmäßig in $\frac{1}{2}$ mm dünner Schichte auf den Glasobjektträger (O) gebracht. Dieser wurde auf dem Kupferblock (KB) mit 10 Schrauben derart befestigt, daß ein guter

Wärme- bzw. Kältekontakt zwischen Glas und Kupferblock gewährleistet war. Um eine wasserfreie Stickstoffatmosphäre in der Rezipientenglocke zu erhalten und einen Eisniederschlag auf der Objektoberfläche zu vermeiden, wurde in der Rezipientenglocke ein leichtes Vak. erzeugt und über das Gaseinlaßventil (GE) getrockneter, gasförmiger Stickstoff dosiert eingeleitet. Eine vor die Waschflaschenkolonne geschaltete Gummiblase (GB) gab den Druckausgleich zwischen Stickstoffbombe und Apparatur zu erkennen. Dieser Vorgang wurde fünfmal wiederholt.

Anschließend wurde das Kühlgefäß (KG₂) mit flüssigem Stickstoff gekühlt, und das Objekt in das vorher mit flüssigem Stickstoff gefüllte Dewar-Gefäß (KG₁) eingetaucht. Innerhalb weniger als 1 Sekunde sank die Temperatur von + 20° auf - 120° und stellte sich nach wenigen Sek. auf etwa - 140° ein. An die Kühlung schloß sich unmittelbar das Evakuieren der Rezipientenglocke an. Nach etwa 3 Std. war der verdampfende flüssige Stickstoff abgepumpt und es wurde ein Hochvakuum von $5,10^{-6}$ Torr erreicht.

Zur Sublimation des Eises wurde bei der wasserhaltigen emulgierenden Salbe eine zusätzliche Beheizung vorgenommen. Zu diesem Zweck wurde das Präparat mit der Blende (Bl) zur Hälfte abgeschirmt und mit der Mikroheizquelle (MHZ) beheizt. Das Vakuum verschlechterte sich innerhalb von 7 Min. auf $1 \cdot 10^{-4}$ Torr. Die Beheizung wurde abgebrochen, als wieder eine sichtbare Verbesserung des Vak. auf dem Diagrammschreiber zu beobachten war. Da in der Zeiteinheit von der Hochvakuumpumpe (HVP) gleichmäßig konstante Dampfvolamina abgepumpt werden, war die Verbesserung des Vak. das Anzeichen für die Beendigung des Sublimationsvorganges.

Nach Auswertung von stereoskopischen Abbildungen und Berechnung nach *B. G. Malmström*¹⁴⁾ kann eine Dicke der absublimierten Eisschicht von 5000 Å angenommen werden.

Die folgende Kohlebedampfung wurde unter einem Winkel von 35° 3 Sek. durchgeführt, womit 100 Å dicke Kohlefilme erhalten wurden. Durch das Fernrohr (F) konnte der gesamte Vorgang beobachtet werden.

Nach der Verdampfung wurde das Objekt langsam aufgetaut und der Rezipientenglocke entnommen. Anschließend wurden die Kohlefilme in heißem Wasser bzw. heißem Methylenchlorid von den Objekten abgelöst und in kleine quadratische Stücke von $\frac{1}{2}$ mm Seitenlänge geschnitten und in 10 Bädern von Methylenchlorid zu je 10 Min. gespült. Für diesen Spül- und Reinigungsvorgang wurde kleine Petrischalen (Ø 50 mm, 20 mm Höhe) verwendet, die halb gefüllt waren. Die Kohlenfilmabdrücke wurden auf einem Tropfen mit einer Platinschlinge von einem Bad zum anderen übertragen. Die gewaschenen Kohleabdrücke wurden mit einem Objektträgernetzchen herausgenommen und in einem Exsikkator getrocknet. Nach dem Trocknen standen die Kohlefilmabdrücke bereit zur Untersuchung im Elektronenmikroskop.

¹⁴⁾ Exp. Cell. Res. 2, 688 (1951).