

Eine Methode zur Messung von Kohlenstoff-14 oder Tritium in biologischen Flüssigkeiten

Von

S. Apelgot*, R. Chemama und M. Frilley**

Mit 10 Abbildungen

(Eingegangen am 11. Juni 1970)

A Technique for the Direct Counting of ^{14}C or ^3H in Biological Fluids

The technique described here permits the measurement of radioactivity (^{14}C or ^3H) contained in urine, whole blood and plasma. Aliquots of 20 to 100 mm³ of these liquids are placed on glass fibre papers which are then immersed directly (wet or dried) in liquid scintillator containing dioxane. Preliminary tests and the study of the pulse height spectra have enabled us to define optimal counting conditions, in every case studied. The efficiencies are reproducible and higher than those obtained with the classical strong base or hydrogen peroxide treatments. Because the calibration curves are reproducible, it is unnecessary to determine the efficiency of each counting. As no preliminary treatment is necessary and as no spurious luminescence ever occurs, the results of counting are known one to four hours after sampling.

Zur Messung der Radioaktivität (^{14}C oder ^3H) in Harn, Vollblut und Blutplasma werden aliquote Volumina (20 bis 100 mm³) auf Glasfaserpapiere aufgebracht und diese sodann (feucht oder nach Trocknung) in einen dioxanhaltigen flüssigen Szintillator eingetaucht. Durch vorherige Eichmessungen und Bestimmungen der Impulsgrößenspektren war es möglich, für jeden einzelnen Fall die optimalen Zählbedingungen festzulegen. Die Zählausbeuten sind reproduzierbar und höher als jene, die man mit klassischen Methoden — Behandlung der Proben mit starken Basen oder H_2O_2 — erzielt. Da die Eichkurven reproduzierbar sind, erübrigt es sich, bei jeder Zählung die Ausbeute zu bestimmen. Die Meßergebnisse liegen bereits 1 bis 4 Stdn. nach der Probennahme vor, da eine Vorbehandlung der Proben nicht erforderlich ist und keine Störlumineszenz auftritt.

* Herrn Prof. Dr. E. Broda zum 60. Geburtstag gewidmet.

** Mit der technischen Hilfe von G. Tham, Fondation Curie — Institut du Radium, 11, rue P. et M. Curie, und 26, rue d'Ulm, Paris 5^e.

Die Radioaktivität (^{14}C oder ^3H) wäßriger Materialien wie Harn, Vollblut und Blutplasma läßt sich in flüssigen Szintillatoren messen. Bisher hielt man jedoch stets eine Vorbehandlung der Proben für erforderlich. Blut wurde gewöhnlich in einer starken Base, z. B. Hyamin, aufgenommen¹, Harn mittels Aktivkohle oder durch Behandlung mit Wasserstoffperoxid entfärbt². Die Aufbereitung der Proben nach diesen Methoden ist langwierig; außerdem führt der Zusatz von starker Base oder Wasserstoffperoxid zu flüssigen Szintillatoren zu einer beträchtlichen Verminderung der Zählausbeute (Löschung). Überdies muß die Ausbeute für jede Zählung eigens ermittelt werden, da die Schwankungen von Messung zu Messung beachtlich sind. Die ebenfalls verwendete Verbrennungsmethode gibt gute Zählausbeuten, bereitet jedoch andere Schwierigkeiten³.

Unser Ziel war es, die Radioaktivität der biologischen Flüssigkeiten direkt zu messen. Dabei kam uns zugute, daß einer von uns in früheren Experimenten gezeigt hatte, daß die Verwendung von Elektrophoresemembranen die Messung der Radioaktivität von ^{14}C oder ^3H in wäßrigen Lösungen erleichtert^{4, 5}. Diese Methode ließ sich durch den Einsatz von Glasfaserpapieren noch verbessern⁶. Wir überzeugten uns davon, daß Lumineszenz in den flüssigen Szintillatoren nicht hervorgerufen wird, wenn diese mit Membranen, Glasfaserpapieren oder frisch entnommenem Vollblut, Plasma und Harn versetzt werden. Die vorliegende Arbeit berichtet von den durch diese biologischen Flüssigkeiten bewirkten Änderungen der Zählausbeute.

Material und Methoden

1. Zählinstrument

Automatisches Flüssigkeitsszintillationsspektrometer der Fa. Nuclear Enterprises (Großbritannien) mit einfachem Photovervielfacher.

2. Flüssige Szintillatoren

a) Mischung NE 211* mit Xylol als Lösungsmittel, mit Wasser nicht mischbar;

b) Mischung NE 220*, dioxanhaltig, kann mit 10% Wasser versetzt werden.

* Codezahl der Nuclear Enterprises.

¹ J. Dulcino, R. Bosco, W. G. Verly und J. R. Maisin, Clin. Chim. Acta **8**, 58 (1963).

² G. A. Bruno und J. E. Christian, Analyt. Chem. **33**, 1216 (1961).

³ G. N. Gupta, Analyt. Chem. **38**, 1356 (1966).

⁴ S. Apelgot und M. Duquesne, J. Chim. Physique **58**, 774 (1961).

⁵ S. Apelgot, Rapport Euratom N°. Eur. 2459 b (1965).

⁶ J. W. Davies und E. C. Cocking, Biochem. Biophys. Acta **15**, 511 (1966).

Zu jeder Messung verwendeten wir in der Regel 1 cm³ des einen oder des anderen flüssigen Szintillators.

3. Glasfaserpapier

Whatman GF/A.

4. Eichlösungen

a) ³H: Hexadecan-³H; Thymidin-6-³H in wäßr. Lösung (Radiochemical Centre, England);

b) ¹⁴C: Benzoesäure; Thymidin-2-¹⁴C in wäßr. Lösung (N.E.N., USA) oder Fructose-¹⁴C in wäßr. Lösung (C.E.A., Frankreich).

5. Tiere

Männliche oder weibliche Mäuse verschiedener Stämme wurden mit folgenden markierten Verbindungen gefüttert:

a) mit tritiiertem Wasser (C.E.A., Frankreich);

b) mit einem Nukleotid: Thymidin-6-³H oder -2-¹⁴C (C. E. N., Belgien);

c) mit Steroiden: Chlormadinon-1-³H (Synthex, USA); Pregnenolon-4-¹⁴C (Radiochemical Centre, England).

In zwei Versuchen verabreichten wir einem Menschen Lynöstrenol-¹⁴C (Organon, Holland) bzw. Chlormadinon-1-³H (Synthex, USA).

Ergebnisse

Die Charakteristika unserer Zählleinheit sind in Tab. 1 wiedergegeben. Zur Messung der Radioaktivität biogener Flüssigkeiten ließen sich zwei Methoden anwenden:

a) Unmittelbares Vermischen der Probe mit dem flüssigen Szintillator NE 220, wobei der Wasseranteil 10% nicht übersteigen durfte;

b) Aufbringen der Probe auf ein Glasfaserpapier, das entweder in NE 220 eingetaucht wird, solange es noch feucht ist, oder unter einer Infrarotlampe getrocknet wird, bevor man es in NE 220 oder NE 211 taucht.

Tabelle 1. Charakteristik des Flüssigszintillationsspektrometers
Zur Eichung dienten Lösungen von ³H-Hexadecan und ¹⁴C-Benzoesäure; 20 mm³ Eichlösung wurden jeweils zu 1 cm³ Szintillatorlösung zugemischt. Alle Proben wurden dreifach angesetzt; jeder Wert ist das Mittel von wenigstens zwei Meßergebnissen

Szintillator	¹⁴ C		³ H	
	Leerwert (Imp./Min.)	Zählausbeute <i>E</i> (%)	Leerwert (Imp./Min.)	Zählausbeute <i>E</i> (%)
NE 211	15	99	20	30
NE 220	15	95	25	28

Wir erprobten jede dieser Methoden mit ^{14}C - und ^3H -Eichlösungen, verdünnt mit Wasser, Harn, Vollblut bzw. Plasma. Mit Hilfe dieser Kalibrierungen präzisierten wir unsere Zählbedingungen, die wir dann bei der Messung radioaktiver Proben einhielten.

A. Kalibrierungen

1. Verdünnung mit Wasser

Wäßrige ^{14}C - und ^3H -Standardlösungen wurden mit dreifach destilliertem Wasser verdünnt; zur Messung kamen Volumina von 20 bis

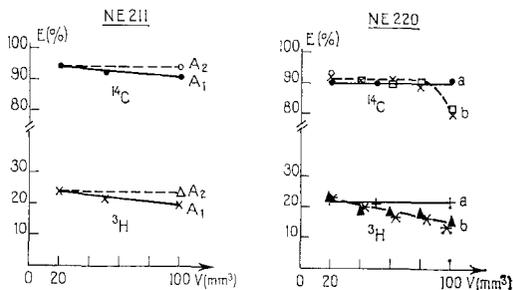


Abb. 1. Einfluß des Volumens V der radioaktiven Lösung auf die Zähl- ausbeute E . a: Das Glasfaserpapier mit den radioaktiven Proben wurde vor Einführung in den flüss. Szintillator getrocknet. A_1 : Jedes Glasfaserpapier wurde für sich allein gemessen; A_2 : 5 Glasfaserpapiere mit je 20 mm^3 Eich- lösung wurden miteinander in 1 cm^3 flüss. Szintillator gemessen; b: Die radioaktiven Proben wurden entweder unmittelbar (ohne Verwendung von Glasfaserpapier) zu 1 cm^3 NE 220 zugemischt (*, x) oder auf Glasfaserpapier (ohne Trocknung) in 1 cm^3 NE 220 gemessen (\blacktriangle , \square)

100 mm^3 . Wie die Versuche zeigten, fällt im Falle des getrockneten und dann in NE 211 getauchten Glasfaserpapiers die Zähl ausbeute mit steigendem Probenvolumen leicht ab (Abb. 1, A_1); dies beruht auf den geometrischen Verhältnissen, nicht auf einer Eigenabsorption. Wenn 100 mm^3 radioaktiver Lösung auf fünf Glasfaserpapiere (20 mm^3 je Papier) aufgebracht und diese nach dem Trocknen übereinander- geschichtet in einem Zählröhrchen, das 1 cm^3 NE 211 enthält, gemessen werden, ist die Zähl ausbeute die gleiche wie bei der Messung eines Glasfaserpapiers mit 20 mm^3 (Abb. 1, A_2). Mißt man das getrocknete Glasfaserpapier in NE 220, so bleibt die Radioaktivität, wenn das Papier herausgenommen wird, im flüssigen Szintillator; bei NE 211 ist das nicht der Fall. NE 220 extrahiert demnach die radioaktiven Verbindungen aus dem Glasfaserpapier. Dadurch wird, wie weitere Versuche bestätigten, der bei NE 211 beobachtete geometrische Effekt aufgehoben (Abb. 1 a).

Wenn ein feuchtes Glasfaserpapier in NE 220 eingetaucht wird, ist die Zählausbeute ebenso groß wie bei unmittelbarer Vermischung der Probe mit dem flüssigen Szintillator. In beiden Fällen nimmt die Zähl- ausbeute mit zunehmendem Probenvolumen leicht ab. Sie liegt immer unter der mit getrocknetem Glasfaserpapier beobachteten Zähl- ausbeute (Abb. 1 a und 1 b).

Wenn man ein Zählröhrchen mit fünf getrockneten Glasfaserpapieren und mit 1 cm^3 NE 220 versieht, ist die gemessene Aktivität gleich groß wie die Summe der getrennt gemessenen Aktivitäten der 5 einzelnen Papiere. Es ist demnach möglich, in 1 cm^3 NE 220 die Aktivität von 500 mm^3 wäßriger Lösung, auf 5 Papiere mit je 100 mm^3 verteilt, mit einer Zähl- ausbeute zu bestimmen, die von der gleichen Größenordnung ist wie bei der Messung von 20 bis 100 mm^3 nach Trocknung auf einem einzigen Papier.

2. Verdünnung mit Harn

Für Harn besteht die beste Meßmethode darin, daß man 100 mm^3 auf ein Glasfaserpapier aufbringt, dieses trocknet und in NE 220 mißt. Die Zähl- ausbeute ist dann bei Verwendung von ^{14}C nahezu gleich hoch wie in wäßriger Lösung; für ^3H liegt sie etwas niedriger. Der durch Schwankungen in der Zusammensetzung des Harns bedingte Fehler beträgt im ungünstigsten Falle weniger als 10%.

Wir definierten unsere Meßbedingungen durch folgende Versuche: Wäßr. radioaktive Lösungen wurden einerseits mit dreifach destill. Wasser, andererseits mit verschiedenen Harnproben verdünnt. Für Zwecke der Eichung gaben wir für die gemessenen Aktivitäten nicht die Zähl- ausbeute E , sondern die relative Ausbeute R (bez. auf die Messungen an mit Wasser verdünnten Proben) an; so wurden geometrische Faktoren und die besonderen Eigenschaften der Meßeinheit eliminiert und der Löscheffekt des Harns trat klar hervor (Abb. 2).

Bei Verwendung getrockneter Glasfaserpapiere und NE 211 stört Harn nur geringfügig, wenn ^{14}C bestimmt wird; für ^3H jedoch liefert diese Methode mit verschiedenen Harnproben unterschiedliche Ergebnisse, wobei die beobachteten Schwankungen beträchtlich sind (Abb. 2, A_1 und A_2).

Mischt man Harn dem Szintillator NE 220 unmittelbar zu, sind die Resultate nicht reproduzierbar, selbst wenn man die Meßproben gleichzeitig mit dem gleichen Harn herstellt; vermutlich, weil sich im Szintillator eine Emulsion bildet.

Wendet man die Glasfaserpapier-Methode an, sind die Zählergebnisse reproduzierbar; die relative Ausbeute ist höher, wenn die Papiere vor

der Messung getrocknet worden sind (Abb. 2). In diesem Falle ist die Herkunft des Harns so gut wie ohne Einfluß auf die Bestimmung des ^{14}C (Abb. 2a) und von geringem Einfluß auf die des ^3H (Abb. 2, a₁ und a₂). Die Schwankungen der relativen Zählausbeute bei der Messung von ^3H in Harnproben nehmen mit steigendem Volumen des Harnaliquots zu: Für 100 mm³ beträgt die Streuung ungefähr 10% (Abb. 2, a₁ und a₂).

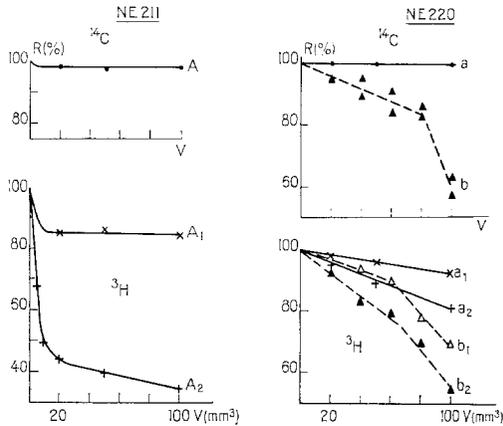


Abb. 2. Einfluß von Harn auf die Aktivitätsmessungen. Wäßrige Eichlösungen wurden entweder mit dreifach destill. Wasser oder mit Harn verdünnt. Verschiedene Volumina dieser verd. Lösungen wurden in 1 cm³ NE 211 oder NE 220 gemessen. Für jedes Volumen und jede der verschiedenen Methoden wurde die gemessene Aktivität nach Verdünnung der Eichlösung mit Wasser gleich 100% gesetzt. R ist das Verhältnis der für die Radioaktivität der Probe nach Verdünnung mit Harn bzw. mit Wasser gemessenen Werte. Die Zählausbeute ist jeweils das Produkt $R \times E$; der Wert E ist der Abb. 1 zu entnehmen. Die Proben wurden auf Glasfaserpapiere aufgebracht und diese entweder (A und a) getrocknet in 1 cm³ NE 211 bzw. NE 220 oder (b) feucht in 1 cm³ NE 220 gemessen. Jede Kurve ist das Ergebnis von wenigstens drei Experimenten mit verschiedenen Harnproben. Die Punkte sind Mittelwerte von Messungen, deren Streuung nicht größer als der experimentelle Fehler war

Die Kurven a₂ und A₂ wurden mit nur einer Harnprobe erhalten, die insofern eine Ausnahme darstellte, als die Harnprobe stark gefärbt und trüb war; fünf andere Proben gaben Kurven, die der Kurve a₁ sehr nahe lagen.

3. Verdünnung mit Vollblut

Die geeignetste Methode besteht darin, daß man 20 bis 50 mm³ Vollblut auf ein Glasfaserpapier aufträgt, welches sodann feucht in 1 cm³ NE 220 zur Messung gebracht wird. Im Gegensatz zum Harn beeinflusst

Vollblut die Zählausbeute beträchtlich. Im Falle des ^{14}C läßt sich die Ausbeute durch eine günstigere Einstellung des Verstärkers verbessern. Diese besondere Einstellung (*P*-Einstellung) wird weiter unten beschrieben.

Um Verdunstung zu vermeiden, die zu nicht reproduzierbaren Ergebnissen führt, muß man die mit den Proben versehenen Glasfaserpapiere ohne Verzug in den flüssigen Szintillator eintauchen. Volumina von 20 bis 50 mm³ wurden bevorzugt, da mit ihnen eine genaue Probenahme möglich und eine annehmbare Zählausbeute zu erzielen ist. Aliquote von 100 mm³ geben schlechter reproduzierbare Ergebnisse.

Zu unserer Wahl bestimmten uns Versuche, bei denen wir — wie im Falle des Harns — wäßrige Eichlösungen mit Vollblut und mit Wasser verdünnten und die Aktivitäten in relativer Ausbeute *R* ausdrückten.

Zur Gerinnungshemmung vermischten wir das Vollblut mit Heparin. Heparinisiertes Vollblut und durch Behandlung mit Glaskugeln defibriertes Blut geben gleiche Zählausbeuten.

Bei Radioaktivitätsmessungen im Vollblut mit getrocknetem Glasfaserpapier ist die Zählausbeute sehr gering, ob der eine oder der andere Szintillator verwendet wird (Abb. 3, A und a). Wenn die Blutprobe mit NE 220 direkt vermischt wird, kommt es zum Ausflocken und die Messungen sind nicht reproduzierbar. Wird das Blut in NE 220 mit Hilfe feuchter Glasfaserpapiere gemessen, bleiben die Zählausbeuten sowohl für ^3H als auch für ^{14}C niedrig (Abb. 3, b). Um diese starke Löschung, die sogar bei ^{14}C und bei kleinen Volumina (10 mm³) auftritt, zu verstehen, untersuchten wir das Impulshöhenspektrum. Es zeigte sich, daß ^{14}C -Impulse durch Vollblut (Abb. 4, A und S) viel mehr als durch Harn (Abb. 4, A und U) beeinträchtigt werden: In Gegenwart von Vollblut sind die Impulse der Höhe nach stark beschnitten und finden sich vornehmlich in einem Bereich, in dem die Abhängigkeit der Impulshöhe von der β -Energie nicht mehr linear ist⁷.

Dieses Ergebnis veranlaßte uns, die Untersuchung des Impulshöhenspektrums unter Verwendung der gewöhnlichen ^3H -Verstärkereinstellung zu wiederholen. Wir fanden, daß in Gegenwart von Ganzblut, unabhängig von der Größe des Aliquots, die ^{14}C -Impulshöhenspektren die gleiche Gestalt wie die ^3H -Impulshöhenspektren haben (Abb. 4, B und C). Im Falle von ^3H wird die Gestalt der Impulshöhenspektren durch anwesendes Vollblut geringfügig verändert (Abb. 4, C).

Wir wählten deshalb eine geeignetere Einstellung für die Messung des im Ganzblut vorhandenen ^{14}C ; dabei verwendeten wir die gleiche Verstärkung und die gleiche untere Pulshöhenbegrenzung wie bei ^3H -Messungen, aber ohne obere Pulshöhenbegrenzung, weil im ^{14}C -Impulshöhenspektrum Impulse hoher Energie noch vorhanden sind

⁷ M. Duquesne, C. r. hebdomad. Sé. Acad. Sci. Paris 268, 76 (1966).

(Abb. 4, B und S). Diese besondere ^{14}C -Einstellung, die wir „*P*-Einstellung“ nennen, hat in allen untersuchten Fällen zu einer Erhöhung der gemessenen Aktivitäten (Imp./Min.) geführt, während der Leerwert eine nur kleine Änderung erfuhr. Bei Messungen von ^{14}C in Ganzblut beobachteten

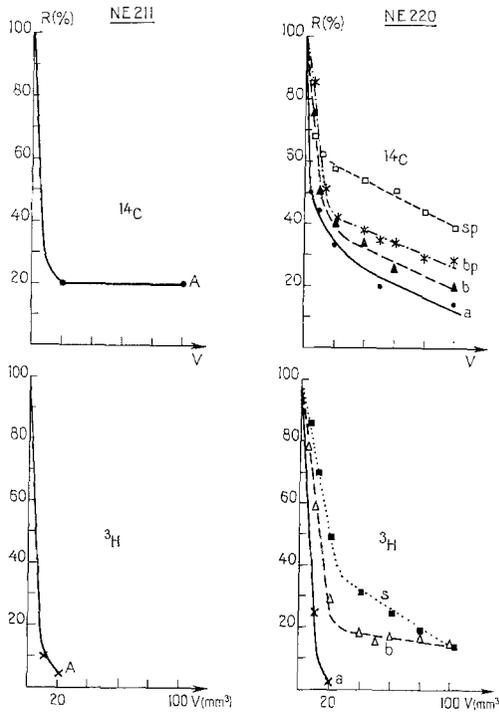


Abb. 3. Einfluß von Blut auf die Aktivitätsmessungen. Aliquote Blutvolumina wurden auf Glasfaserpapiere aufgebracht und diese entweder (A und a) nach Trocknen unter einer Ultrarotlampe in 1 cm^3 NE 211 bzw. NE 220 oder (b und s) feucht in 1 cm^3 NE 220 oder (bp und sp) ebenfalls feucht in 1 cm^3 NE 220, aber mit der *P*-Einstellung gemessen. Für die den Kurven b und bp zugrunde liegenden Messungen wurden jeweils die gleichen Proben von Humanblut, für s und sp das Blut von Mäusen (Stämme AKR, SWISS oder C 57 B 1) herangezogen. Die *P*-Einstellung kam bei ^{14}C -Messungen zur Anwendung

wir sowohl eine Zunahme der Zählausbeuten E (Abb. 5) als auch der relativen Ausbeuten R (Abb. 3, b und p); allerdings blieb R für Vollblut auch bei Verwendung der „*P*-Einstellung“ niedrig.

Diese Resultate wurden mit Humanblut erhalten. Schwankungen, wie sie bei verschiedenen Vollblutproben zu beobachten waren, gingen über die experimentellen Fehler niemals hinaus; die Kurven der Abb. 3 sind reproduzierbar.

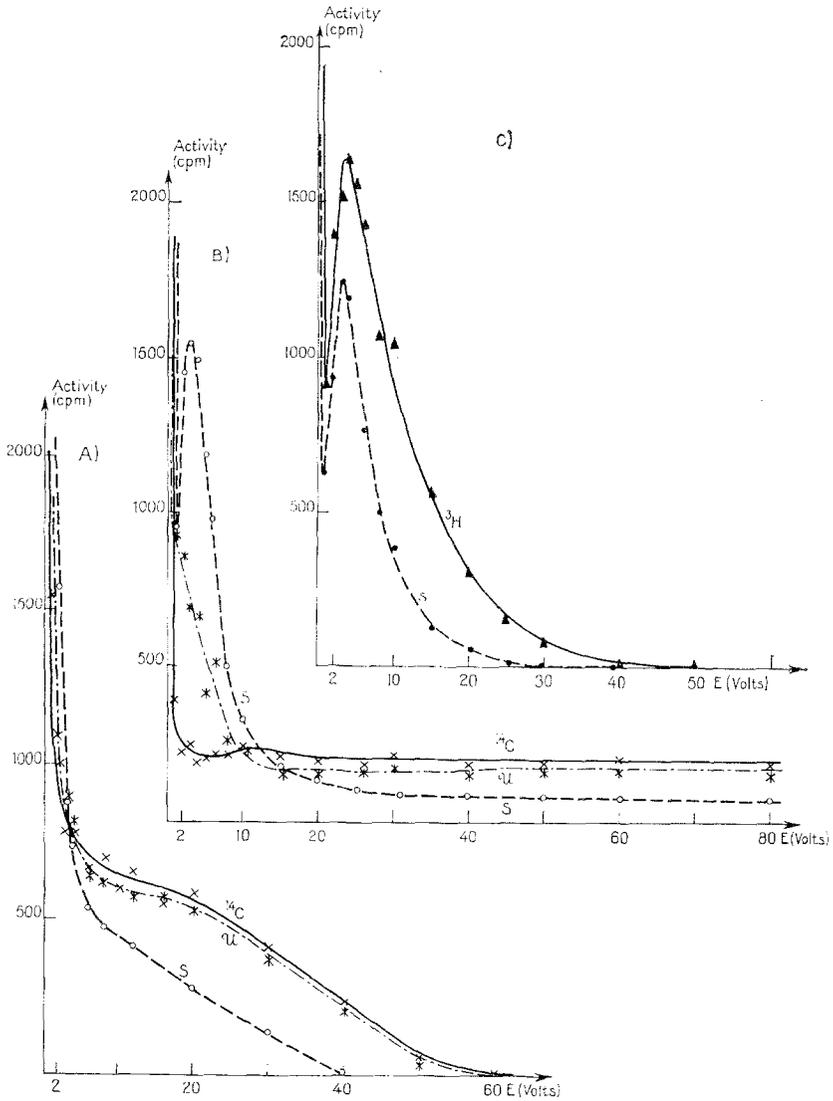


Abb. 4. Impulsgrößenpektren in NE 220 (1 cm³). Aliquote Volumina wurden auf Glasfaserpapier aufgebracht. A) Normaleinstellung für ^{14}C ; B) Normaleinstellung für ^3H ; C) Normaleinstellung für ^3H . ^{14}C —x—: ^{14}C -Eichlösung (19 500 Zerf./Min.); S—o—: ^{14}C -Fruktose (14 200 Zerf./Min.) in 50 mm³ Humanblut; U—: ^{14}C -Fruktose (14 200 Zerf./Min.) in 50 mm³ Harn; ^3H —▲—: ^3H -Eichlösung (54 000 Zerf./Min.); S—●—: ^3H -Thyminidin (21 000 Zerf./Min.) in 50 mm³ Mäuseblut

Bei Messungen an Blut von Mäusen dreier verschiedener Stämme nach den gleichen Methoden (P -Einstellung für ^{14}C) hielten sich die Veränderungen der Impulshöhenspektren im gleichen Rahmen wie bei den Beobachtungen an Humanblut, doch waren die relativen Meßausbeuten R höher (Abb. 3, s und S_p). Dies zeigt, daß man mit Ganzblutproben von Tieren der gleichen Art Zählausbeuten der gleichen Größenordnung erreicht, diese jedoch von einer Species zur anderen verschieden sind.

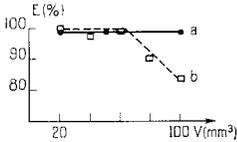


Abb. 5

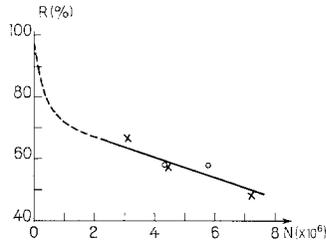


Abb. 6

Abb. 5. ^{14}C -Messung in NE 220 (1 cm^3). Für die Aufstellung dieser Kurve dienten die gleichen Proben wie für die ^{14}C -Kurven der Abb. 1, doch wurde die P -Einstellung angewendet; a) —●—: getrocknete Glasfaserpapiere; b) - - - □ - - -: feuchte Glasfaserpapiere

Abb. 6. Einfluß der Erythrocytenzahl auf die ^3H -Bestimmung in Mäuseblut. Die wäßr. ^3H -Eichlösung wurde mit dreifach destill. Wasser oder mit dem Blut normaler oder anämischer Mäuse verdünnt. 20 mm^3 -Proben der verd. Lösungen wurden auf Glasfaserpapiere aufgebracht und diese feucht in 1 cm^3 NE 220 gemessen. Für jede Blutprobe wurde die Anzahl der Erythrocyten je cm^3 (N) bestimmt

Die nächste Frage war, ob diese Artunterschiede auf einen verschiedenen Erythrocytengehalt der Blutproben zurückzuführen sind. Um sie zu beantworten, verwendeten wir Ganzblut normaler und durch Röntgenbestrahlung anämisch gemachter Mäuse. Im ungünstigsten Falle, bei Messung von ^3H , stieg die relative Zählausbeute R bloß um ungefähr 10%, wenn sich die Erythrocytenzahl auf die Hälfte verminderte (Abb. 6); diese geringe Abweichung muß man nicht berücksichtigen, wenn Radioaktivität im Blut nach dieser Methode bestimmt wird. Unterschiede des Erythrocytengehaltes sind jedenfalls für das verschiedene Verhalten von Human- und Mäuseblut bei den Aktivitätsmessungen nicht verantwortlich.

4. Verdünnung mit Plasma

Für Plasma ist wieder NE 220 der günstigste Szintillator. Die Verwendung feuchter Glasfaserpapiere empfiehlt sich als die beste Methode zur ^3H -Messung. Sie ist bei ^{14}C -Bestimmungen nur dann der Verwendung getrockneter Glasfaserpapiere überlegen, wenn kleine Plasma-Volumina und nichthämolytische Plasmaproben verwendet werden. Mit der P -Einstellung sind die Zählausbeuten für ^{14}C in allen untersuchten Fällen etwas höher als mit den gebräuchlichen Einstellungen.

Unabhängig von der benutzten Methode sind die Zählausbeuten mit Plasma besser als mit Vollblut (Abb. 7 und 3). Bei Verwendung von NE 211 und getrockneten Glasfaserpapieren sind die Ausbeuten kleiner als mit Urin (Abb. 2, A, A₁, A₂; Abb. 7, A, A₁, A₂); die Werte streuen von einer Plasmaprobe zur anderen ziemlich stark (Abb. 7, A₁ und A₂).

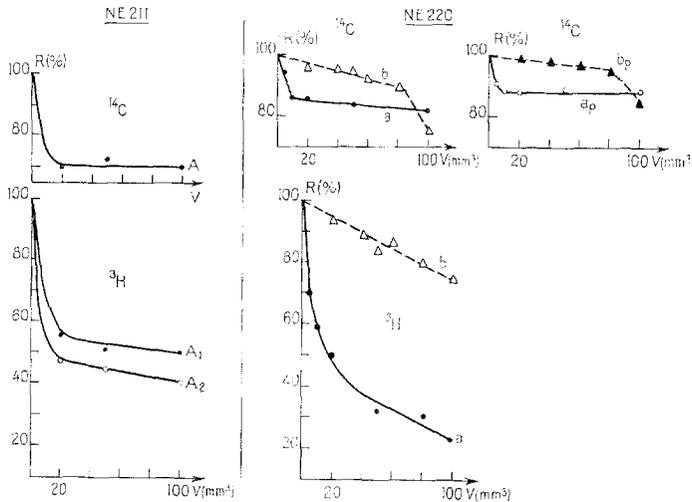


Abb. 7. Einfluß von Blutplasma auf die Aktivitätsbestimmungen. Aliquote Plasmavolumina wurden auf Glasfaserpapiere aufgebracht und diese entweder (A; a, a_p) getrocknet in 1 cm³ NE 211 bzw. NE 220 oder (b, b_p) feucht in 1 cm³ NE 220 gemessen. Für a_p und b_p wurde die P-Einstellung angewendet

Wenn Plasma dem NE 220 unmittelbar beigemischt wird, entsteht — wahrscheinlich durch die Einwirkung des im NE 220 enthaltenen Dioxans auf die Plasmaproteine — ein weißer Niederschlag; die Messungen sind nicht gut reproduzierbar. Wird Plasma, auf Glasfaserpapier aufgebracht, in NE 220 ausgemessen, sind die Resultate reproduzierbar; die Zählausbeuten liegen höher, wenn die Glasfaserpapiere feucht sind (Abb. 7 a und b).

Setzt man kleine Plasmavolumina (bis zu 50 mm³) ein, beobachtet man — wie bei Urin — eine Verlagerung der Impulshöhenspektren für ¹⁴C; verwendet man größere Aliquote (100 mm³), sind die Spektren in ähnlicher Weise wie bei Vollblut verzerrt. Bei Messung von 100-mm³-Proben erhält man mit der P-Einstellung für ¹⁴C wieder ein Impulshöhenspektrum der gleichen Art wie für ³H. Nimmt man ¹⁴C-Bestimmungen im Plasma mit der P-Einstellung vor, ist die Zählausbeute etwas höher, wenn das Probenvolumen weniger als 50 mm³, und stärker erhöht,

wenn es 100 mm^3 beträgt (Abb. 7 b). Dies veranlaßte uns, die *P*-Einstellung für die Messung von ^{14}C in Plasma allgemein anzuwenden.

Es ist leicht, aus Humanblut nichthämolytisches Plasma zu gewinnen, nicht aber aus Mäuseblut. Wir prüften daher die Abhängigkeit der Zähl- ausbeute *R* vom Ausmaß der Hämolyse. Zu diesem Zweck fügten wir verschiedene Mengen Hämoglobin zu nichthämolytischem Humanplasma und bestimmten die Radioaktivität dieser hämolytischen Proben auf Glasfaserpapier in NE 220; parallel dazu wurde auch die optische Dichte der Proben, mit physiologischer Kochsalzlösung 1 : 20 verdünnt, bei $540 \text{ m}\mu$ ermittelt. Bei Einsatz großer Plasmavolumina (100 mm^3) war die Zähl- ausbeute schon bei geringer Hämolyse niedrig (Abb. 8, A). Die Untersuchung der Abhängigkeit der Zähl- ausbeute vom Hämolyse- ausmaß an 20 mm^3 -Aliquoten zeigte dann, daß die Ausbeute mit zu- nehmender Hämolyse zunächst absinkt und schließlich einen Grenzwert erreicht; sie nimmt bei ^3H stärker ab als bei ^{14}C , bei Verwendung getrockneter Papiere stärker als bei Verwendung feuchter Papiere (Abb. 8, B und C).

Bei der Bestimmung von ^3H in hämolytischem Mäuseblutplasma stimmten die ermittelten Zähl- ausbeuten mit den Ergebnissen voll- kommen überein, die mit entsprechenden Proben artifiziell hämoly- sierten Humanplasmas erzielt worden waren (Abb. 8, B und C, Punkte * der ^3H -Kurven). Diesem Befund zufolge kommen Unterschiede, wie sie bei den Eichungen mit Blut verschiedener Species zutage traten, bei Plasma praktisch nicht vor*.

B. Die Messung radioaktiv markierter Proben

Für die folgende Untersuchung verwendeten wir die in den Vor- studien als optimal erkannte Methode: Man bringt aliquote Volumsteile

* Wenn das durch Zentrifugieren von Blut gewonnene Plasma im Kühl- schrank bei $+ 4^\circ \text{C}$ in Kunststoffröhrchen (jeglicher Art) aufbewahrt wird, spielen sich, wie wir beobachteten, (nicht näher untersuchte) Reaktionen ab, die zur Folge haben, daß im flüssigen Szintillator NE 220 eine Störlumines- zenz auftritt. Diese Erscheinung, die wir 18 Tage lang verfolgten, nimmt beim Stehen des Plasmas in Plastikröhrchen mit der Zeit exponentiell zu. Nach Mischung des Plasmas mit NE 220 bleibt die Störlumineszenz tagelang unverändert. Die zur Plasmagewinnung aus Blut erforderliche Zentrifugation in Plastikröhrchen ist stets kurz genug, daß diese Erscheinung nicht auftritt, sofern man darauf achtet, das Plasma unmittelbar nachher in ein Glasrohr umzufüllen. Auch dann, wenn biologische Flüssigkeiten (Urin, Ganzblut, Plasma) einige Tage bei 4°C in Glasröhrchen gehalten wurden, stellten wir im flüssigen Szintillator eine (allerdings schwächere) Störlumineszenz fest. Es hat daher den Anschein, daß an Proben, die mehr als 24 Stdn. im Kühl- schrank aufbewahrt worden sind, korrekte Messungen nicht mehr vorgenom- men werden können.

auf Glasfaserpapiere auf, die dann entweder trocken oder feucht in 1 cm^3 NE 220 der Aktivitätsmessung unterzogen werden. In jedem einzelnen Fall wurden die Zählhausbeute E und die relative Ausbeute R mit Hilfe der früher aufgestellten Eichkurven ermittelt. Zur Überprüfung benutzten wir mitunter die Methode des inneren Standards.

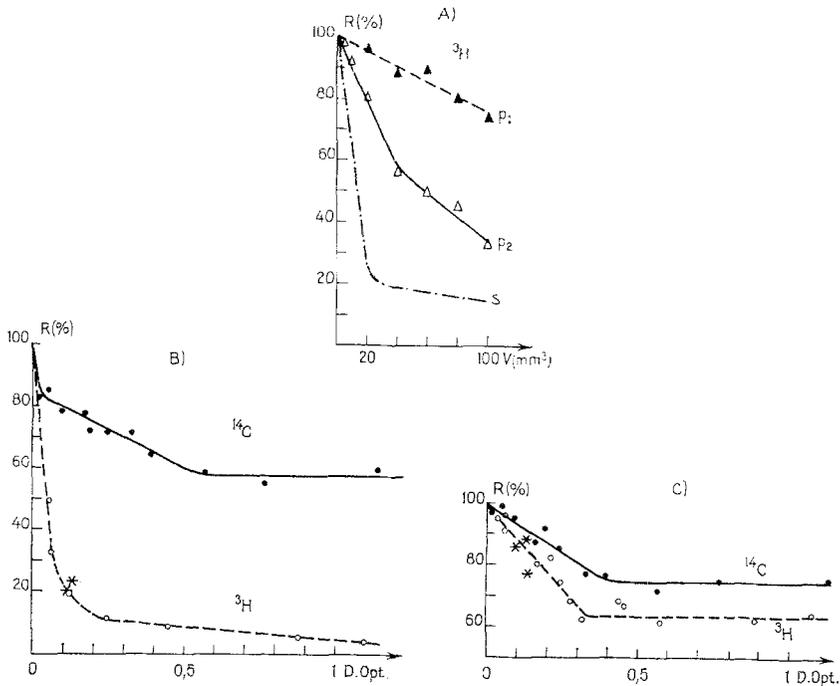


Abb. 8. Einfluß von hämolytischem Plasma auf die Ausbeute der Radioaktivitätsmessung. Die optische Dichte bei $540 \text{ m}\mu$ wurde an Plasma, das mit physiol. NaCl-Lösung 1:20 verdünnt worden war, bestimmt. Die Messungen erfolgten in 1 cm^3 NE 220. A. R (für ^3H) in Abhängigkeit vom Probenvolumen (feuchte Glasfaserpapiere): Kurve S : Vollblut des Menschen; Kurve P_1 : Blutplasma des Menschen (optische Dichte 0.059); Kurve P_2 : Das gleiche Blutplasma nach künstlicher Hämolyse (optische Dichte 0.17). B. Künstlich hämolyisiertes Humanplasma, Messung auf getrockneten Glasfaserpapieren. C. Desgleichen, jedoch auf feuchten Glasfaserpapieren gemessen. Die Punkte (*) beziehen sich auf Proben von hämolytischem Mäuseblut (AKR, SWISS, C 57). Die ^{14}C -Bestimmungen erfolgten mit der P -Einstellung

1. Harn

Der Harn stammte von zwei Personen, deren eine $25 \mu\text{Ci}$ ^{14}C -Lynöstrenol, die andere $500 \mu\text{Ci}$ ^3H -Chlormadinon erhalten hatte. Bezogen auf die Volumseinheit und bei Berücksichtigung der Zählhausbeuten, waren

die gemessenen Aktivitäten (Zerf./Min./mm³) (Tab. 2) konstant. Die nach dieser Methode zur Bestimmung zugerichteten Proben hielten sich unverändert; Messungen wurden im Verlaufe mehrerer Tage vorgenommen. Unterschiede in den Zählausbeuten, entweder von den Eichkurven abgelesen oder bei manchen Bestimmungen nach der klassischen Methode des inneren Standards ermittelt, überschritten niemals die experimentelle Fehlerbreite (Tab. 2). Im Versuch mit ³H-Chlormadinon waren die mittels der direkten Zählmethode ermittelten Aktivitäten jenen ähnlich, die nach Behandlung des Harns mit Hyamin erhalten wurden.

2. Ganzblut

Das Blut stammte von Mäusen, an die entweder ³H-Chlormadinon (35 μ Ci) oder tritiiertes Wasser (40 μ Ci) oder ¹⁴C-4-Pregnenolon (11 μ Ci) oder ¹⁴C-2-Thymidin (8 μ Ci) verfüttert worden war. Für die Messungen setzten wir die Technik der feuchten Glasfaserpapiere ein. Zur ¹⁴C-Bestimmung wurde die *P*-Einstellung verwendet. Dasselbe Probenmaterial ergab bei Mehrfachbestimmungen in allen Fällen die gleichen absoluten Aktivitäten (Zerf./Min./mm³) (Tab. 3). Wie eine Untersuchung der Stabilität der solcherart zubereiteten Proben zeigte und auch schon bei den Eichversuchen wahrgenommen worden war, nimmt die gemessene Aktivität mit der Zeit zu; sie erreicht nach etwa 4 Std. einen Grenzwert, um dann einige Tage lang unverändert zu bleiben (Abb. 9, I). Genaue Messungen lassen sich erst dann vornehmen, wenn der konstante Wert erreicht ist. Entfernt man das mit radioaktivem Blut versehene Glasfaserpapier aus dem NE 220, stellt man fest, daß die Aktivität (³H oder ¹⁴C) das Papier verlassen hat und sich im flüssigen Szintillator befindet.

Die Impulshöhenspektren, die wir mit Proben radioaktiven Blutes von Mäusen, an die eine markierte Substanz verfüttert worden ist, in NE 220 bestimmten, hatten das gleiche Aussehen wie die Eichkurven (Abb. 10, a). Da NE 220 die Radioaktivität aus dem Glasfaserpapier extrahiert, nahmen wir Impulshöhenspektren auch nach der Entfernung des Papiers auf; wir stellten fest, daß sie weiterhin verändert sind (Abb. 10, b). Dieses Ergebnis bedeutet, daß Ganzblut wie ein Filter wirkt, das sowohl die β -Strahlen als auch die im flüssigen Szintillator erzeugten Photonen absorbiert. Der erste Effekt vermindert die Zahl der Impulse, der zweite deren Höhe, wodurch es zu einer Verzerrung der ¹⁴C-Impulshöhenspektren kommt. Wenn das bluthaltige Glasfaserpapier entfernt wird, bleibt die Verzerrung bestehen; sie muß demnach auf Verbindungen, die durch NE 220 extrahiert worden sind, zurückgehen.

Die „Blutfilterwirkung“ hat auf die Gestalt des Impulshöhenspektrums einen nur geringen Einfluß. Sie muß jedoch zum Teil für die niedrigen relativen Zählausbeuten, die mit Hilfe der *P*-Einstellung im

Tabelle 2. Bestimmung der Radioaktivität im Harn des Menschen durch Flüssigkeitszintillationsmessung

Szintillator: 1 cm³ NE 220. Bei dem in Zeile „h“ angegebenen Versuch kamen feuchte, sonst jedoch stets getrocknete Glasfaserpapiere zur Messung. R ist die mit Hilfe von Eichkurven ermittelte relative Zählrate, E die Zählrate in wässrigen Lösungen (Abb. 1). Die Zählrate e_1 wurde durch Berechnung, e_2 mittels der Methode des inneren Standards ermittelt. Beim ³H-Chlormadimon-Experiment wurde für einen Kontrollversuch eine andere Methode, die Vermischung des Harns mit

Hyamin vor der Messung, herangezogen

Verabreichte Verbindung	Volumen der radioaktiven Probe, mm ³	Radioaktivität Imp./Min. Mittel	R (%)	E (%)	$e_1 = R \cdot E$ (%)	Zerf./Min./mm ³	e_2 (%)	Zerf./Min./mm ³ Hyamin
¹⁴ C-Lynöstrenol (25 µCi)	20	275	100	90	90 ± 6	14 300 ± 1430	86.5 ± 13	
		240	258	100	90 ± 6			
		259						
	100	1278	1290	100	90	14 350 ± 1300	87 ± 13	
		1285						
		1307						
³ H-Chlormadimon (500 µCi)	20	906	98	21	20.5 ± 1.5	233 ± 30	19.5 ± 2.9	
		1001	956	98	21			
		962						
	20	1084	1046	96	21	261 ± 34		200 ± 40
		994						
		1061						
³ H-Chlormadimon (500 µCi)	50	2428	2534	96	21	253 ± 27	16 ± 2.4	
		2690						
		2485						
	100	4962	4299	92	21	226 ± 23	15 ± 2.3	
	3870							
	4065							

Tabelle 3. Bestimmung der Radioaktivität in Mäuse-Vollblut durch Flüssigkeitszintillationsmessung Szintillator: 1 cm³ NE 220, Methode: mit feuchten Glasfaserpapieren. Bei der ¹⁴C-Messung kam die „P“-Einstellung zur Anwendung. *R*, *E*, *e*₁ und *e*₂ haben die gleiche Bedeutung wie in Tab. 2. Beim Versuch mit ¹⁴C-Thymidin wurde das Blut vor der Messung mit Hyamin in Lösung gebracht

Verabreichte Verbindung	Volumen der radioaktiven Probe, mm ³	Radioaktivität Imp./Min. Mittel	<i>R</i> (%)	<i>E</i> (%)	$e_1 = R \cdot E$ (%)	Zerf./Min./mm ³	<i>e</i> ₂ (%)	Zerf./Min./mm ³ Hyamin
Tribuiertes Wasser (40 μCi)	20	13 635	49	22	10 ± 1	6820 ± 955	11 ± 1.5	
	30	17 778	36	21	7.5 ± 0.8	7880 ± 940		
	40	19 326	32	20.5	6.5 ± 0.7	7440 ± 820		
	50	21 348	30	19.5	6 ± 0.6	7100 ± 780	7.5 ± 1	
¹⁴ C-Pregnenolon (11 μCi)	20	840	58	99	57.5 ± 6	72 ± 10		
		808						
		812						
¹⁴ C-Pregnenolon (11 μCi)	50	1 759	52	99	51.5 ± 5	68 ± 9	54 ± 8	
		1 739						
¹⁴ C-Thymidin (8 μCi)	100	2 917	40	84	33.5 ± 3.5	85.5 ± 9	25 ± 4	
		2 808						
		113						
¹⁴ C-Thymidin (8 μCi)	20	120	58	99	57.5 ± 6	10 ± 2		
		109						
	50	263	52	99	51.5 ± 5	10 ± 1.5	14.5 ± 3	
		276						
	236							
	252	40	84	33.5 ± 3.5	7.5 ± 1			

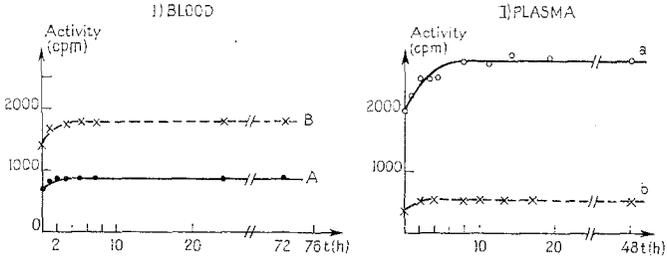


Abb. 9. Zunahme der gemessenen Radioaktivität mit der Zeit bei Bestimmungen in Blut oder Plasma. Die Zeit $t = 0$ entspricht der ersten, unmittelbar nach Eintauchen des Glasfaserpapiers in den flüssigen Szintillator vorgenommenen Bestimmung. Alle Messungen erfolgten in 1 cm^3 NE 220 nach der Methode der feuchten Glasfaserpapiere. I. Blut (A: 20 mm^3 ; B: 50 mm^3) einer Maus, der $11 \mu\text{Ci}$ ^{14}C -Pregnenolon verabreicht worden ist. II. (a) Plasma (20 mm^3) einer Maus, der $252 \mu\text{Ci}$ ^3H -Chlormadinon verfüttert worden ist; (b) Eichkurve: ^3H -Thymidin in 20 mm^3 Humanplasma

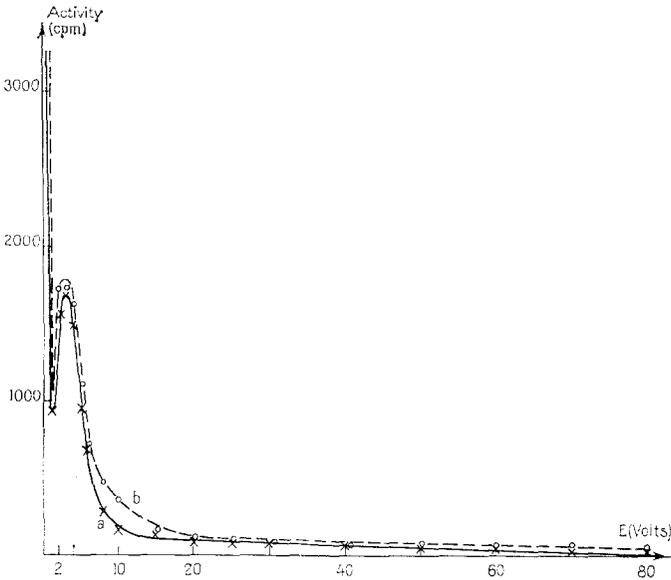


Abb. 10. Impulsgrößenspektrum von ^{14}C in Vollblut. Blut (50 mm^3) einer Maus, der $11 \mu\text{Ci}$ ^{14}C -Pregnenolon verfüttert worden war, wurde auf ein Glasfaserpapier aufgebracht, das hierauf noch feucht in 1 cm^3 NE 220 eingetaucht und der Aktivitätsmessung mit der P-Einstellung unterzogen wurde. Kurve a —x—: Messung des Papiers im flüssigen Szintillator; Kurve b ---o---: Messung des Szintillators nach vorheriger Entfernung des Papiers

Fälle des ^{14}C etwas erhöht werden, verantwortlich sein (Abb. 3, b und b_p). ^3H -Aktivitäten sind nach Entfernung der Glasfaserpapiere vermehrt; die Zunahme wächst mit steigendem Volumen der auf das Papier aufgebrauchten Blutprobe (Tab. 4). Diese Zunahme der gemessenen Aktivität ist das Ergebnis einer gesteigerten Zählausbeute; die Methode des inneren Standards zeigt, daß R für 1 cm³ NE 220, in welches ein Glasfaserpapier mit 20 mm³ Blut eingetaucht und aus dem dieses wieder entfernt worden ist, 70% beträgt. Die gemessenen ^{14}C -Aktivitäten bleiben etwa gleich groß, wenn die Papiere wieder herausgenommen werden. Die bei Blutproben von 100 mm³ beobachteten großen Schwankungen der Meßwerte (^3H und ^{14}C) verschwinden hingegen in allen untersuchten Fällen, wenn die Messungen nach Entfernung der Filterpapiere vorgenommen werden. Dies legt die Annahme nahe, daß für die schlechte Reproduzierbarkeit von Messungen an 100 mm³-Proben wahrscheinlich Unterschiede der „Blutfilter“-Struktur verantwortlich sind.

Tabelle 4. Bestimmung der Radioaktivität von Mäuse-Vollblut mit Glasfaserpapier im Szintillator oder nach Entfernung des Papiers aus dem Szintillator

Szintillator: 1 cm³ NE 220. Das Blut stammte von Mäusen, denen ^3H -Chlormadinon (35 µCi) verfüttert worden war und die zu verschiedenen Zeiten getötet wurden. Das auf Glasfaserpapiere gebrachte Blutvolumen betrug von 20 bis 100 mm³. Die Radioaktivität wurde 4 Stdn. nach Einführung der Papiere in den Szintillator und sodann abermals, nach Entfernung der Papiere aus dem Szintillator, gemessen

Volumen der radioaktiven Lösung, mm ³	Versuch Nr.	Aktivität (Imp./Min.)		b/a
		a) mit Glasfaserpapier	b) nach Entfernung d. Glasfaserpapiers	
20	1	487	537	1,1
		428	533	1,2
	2	6.033	6.929	1,1
		4.824	6.130	1,3
100	3	112	369	3,3
		107	344	3,8
	4	91	327	3,6
		66	263	4

Es erschien uns vielversprechend, die Technik des Zählens nach vorheriger Entfernung der Glasfaserpapiere auf die Bestimmung sehr geringer ^3H -Aktivitäten anzuwenden. Um das Volumen (etwa 0.2 cm³) des mit dem Papier entfernten flüssigen Szintillators mit der in ihm enthaltenen Radioaktivität relativ zum gesamten Volumen so gering zu

Tabelle 5. Bestimmung der Radioaktivität von Mäuse-Blutplasma durch Flüssigkeitsszintillationsmessung

Szintillator: 1 cm³ NE 220. Methode: mit feuchten Glasfaserpapieren. Bei der ¹⁴C-Messung kann die „P^{cc}“-Einstellung zur Anwendung. R, E₁ und e₂ haben die gleiche Bedeutung wie in Tab. 2. Da das Mäuseplasma nicht hämolytisch war, konnten die mit menschlichem Plasma ermittelten Eichkurven verwendet werden. Die optische Dichte wurde bei λ = 540 mμ bestimmt

Verabreichte Verbindung	optische Dichte	Volumen der radioaktiven Lösung	Aktivität (Imp./Min.) Mittel	R (%)	E ₁ (%)	e ₂ (%)	Zerf./Min./mm ³	e ₂ (%)
Chlormadinon- ³ H (35 μCi)	0.035	20	572	95	22	21	134 ± 14	19
			590					
		529	50	88	19.5	17	134 ± 14	20.5
		1203						
		1070						
		1400						
Pregnenolon- ¹⁴ C (14 μCi)	0.025	20	1265	98	99	97	64 ± 7	96
			1199					
		1236	50	96.5	99	95.5	64 ± 5	
		3024						
		2988						
		3147						
100	5027	85	84	71.5	70 ± 5	73		
							5400	
							4800	
4882								

halten, daß es zu vernachlässigen ist, war es notwendig, vom NE 220 10 cm³ zu verwenden. Wenn 100 mm³ Blut solchermaßen in 10 cm³ NE 220 der Messung zugeführt wurden, war die Zählausbeute *R* 80%, also bedeutend höher als in Gegenwart der Faserpapiere (Abb. 3, s).

3. *Plasma*

Wir verwendeten das Plasma von Mäusen, an die ³H-Chlormadinon (35 oder 252 μCi), tritiiertes Wasser (40 μCi), ³-H-Pregnenolon (172 μCi) oder ¹⁴C-Pregnenolon (14 μCi) verfüttert worden war. Die Messungen erfolgten nach der Methode der feuchten Glasfaserpapiere und im Falle von ¹⁴C mit der *P*-Einstellung. Parallelbestimmungen ergaben in jedem Experiment gut übereinstimmende absolute Aktivitäten (Zerf./Min./mm³) (Tab. 5). Da die Zählausbeuten mit Humanplasma erhalten worden waren, kann man annehmen, daß die Eichkurve auch für Mäuseplasma gilt.

Wie experimentell erwiesen wurde, ist die Stabilität von derartigen Plasmaproben mit jener von Ganzblut vergleichbar: Die gemessene ³H- oder ¹⁴C-Aktivität — markierte Verbindungen wurden dem Plasma zugesetzt oder an die Mäuse verfüttert, deren Plasma dann für die Versuche herangezogen wurde — nimmt mit der Zeit zu und erreicht in ungefähr 4 Stdn. ein mehrere Tage lang gleichbleibendes Plateau (Abb. 9, B). Messungen sind selbstverständlich erst nach Ende des Anstieges durchzuführen. Die Aktivität wird vom Glasfaserpapier an das NE 220 abgegeben. Man muß die mit Plasma versehenen Faserpapiere so bald wie möglich in das NE 220 eintauchen, um zu verhindern, daß durch Verdunstung die Reproduzierbarkeit der Messungen beeinträchtigt wird.

C. *Besprechung der Ergebnisse mit Schlußfolgerungen*

Wie diese Untersuchung gezeigt hat, ist es möglich, ohne irgendeine Vorbehandlung die in Harn, Vollblut oder Plasma enthaltene Radioaktivität (¹⁴C oder ³H) zu bestimmen. In allen geprüften Fällen erwies sich der dioxanhaltige flüssige Szintillator NE 220 dem NE 211 überlegen. Wenn aliquote Volumsteile der biologischen Flüssigkeiten mit dem flüssigen Szintillator einfach vermischt werden, sind die Meßergebnisse nicht reproduzierbar. Reproduzierbarkeit wird jedoch dadurch erzielt, daß die aliquoten Volumsanteile zunächst auf ein Glasfaserpapier aufgebracht werden. Ob es um Blut- oder Plasmaproben geht, die Zählausbeuten sind höher, wenn die Glasfaserpapiere feucht gemessen werden. Die Papiere müssen so bald als möglich in 1 cm³ NE 220 eingesenkt werden, da Verdunstung mit einem Verlust an Reproduzierbarkeit verbunden ist. Die Radioaktivität darf erst nach Ablauf von mindestens

4 bis 5 Stdn., wenn der flüssige Szintillator das radioaktive Material aus dem Papier fast vollkommen extrahiert hat, bestimmt werden. Wenn man unmittelbar nach dem Eintauchen der Papiere in den flüssigen Szintillator mißt, erhält man nur approximative „Vorergebnisse“.

Für Harn sind die Zählausbeuten am besten, wenn die Glasfaserpapiere trocken zur Messung kommen. Es ist jedoch klar, daß die Verwendung getrockneter Papiere dann ausgeschlossen ist, wenn man es mit flüchtigen radioaktiven Verbindungen (z. B. mit tritiiertem Wasser) zu tun hat.

Bei allen unseren Experimenten fanden wir, daß NE 220 die Radioaktivität der Proben aus dem Glasfaserpapier extrahiert. Zwei Reihen von Ergebnissen sprechen dafür, daß diese Extraktion fast vollständig ist: man findet stets eine lineare Beziehung zwischen der gemessenen Aktivität (Zerf./Min.) und dem Volumen der Probe; außerdem sind die mit dieser Methode erzielten Resultate jenen, die man mit hyamin-behandelten Proben erhält, sehr ähnlich.

Die Ermittlung von Veränderungen der Impulshöhenspektren der ^{14}C -Szintillatoren in Gegenwart von Vollblut oder Plasma hat es uns erlaubt, für die Aktivitätsmessungen optimale Bedingungen — die *P*-Einstellung — festzulegen.

Die vorliegende Untersuchung zeigt die Reproduzierbarkeit der Eichkurven für jeweils ein bestimmtes Untersuchungsmaterial (Harn, Vollblut, Plasma). Unterschiede zwischen den mit Hilfe eines inneren Standards und auf Grund von Eichkurven ermittelten Werten für die Zählausbeute liegen stets im Rahmen des experimentellen Fehlers. Dieses Resultat erweist, daß es im allgemeinen nicht erforderlich ist, für jede einzelne Messung die Zählausbeute zu bestimmen. Da überdies keine Störluminiszenzen auftreten, liegen schon eine Stunde nach der Probenahme für Harn exakte Meßergebnisse, für Ganzblut und Plasma approximative Vorergebnisse vor; für die letzteren sind die genauen Resultate 4 bis 5 Stunden später bekannt.

Wir sind Herrn Prof. *M. Duquesne* für außerordentlich wertvolle Anregungen, den Synthex Laboratories (USA) und Organon (Holland) für die freundliche Überlassung von ^3H -Chlormadinon und ^{14}C -Lynöstrenol dankbar.

Die Arbeit wurde zum Teil durch Zuwendungen seitens des Commissariat à l'Énergie Atomique unterstützt.