

KFK-141

KERNFORSCHUNGSZENTRUM

KARLSRUHE

KERNREAKTOR
Bau- und Betriebs-Gesellschaft m. B. H.
(Verwaltung der Zentralbibliothek)
2. Juli 1963

Februar 1963

KFK 141

Institut für Strahlenbiologie

Elektron-Spin-Resonanzen in bestrahlten Bakteriophagen
und deren Bestandteilen. I.

Karl G. Zimmer, Wolfgang Köhnlein, Gerhart Hotz, Adolf Müller



KERNREAKTOR

BAU- UND BETRIEBS-GESELLSCHAFT M. B. H.

KARLSRUHE

Sonderdruck aus

STRAHLENTHERAPIE Band 120, Heft 2 (1963)

Herausgegeben von J. Becker, R. Birkner, H. Langendorff, H. Meyer

VERLAG URBAN & SCHWARZENBERG / MÜNCHEN UND BERLIN

Alle Rechte, auch die des Nachdrucks, der photomechanischen Wiedergabe und der Übersetzung, vorbehalten

Aus dem Institut für Strahlenbiologie, Kernforschungszentrum Karlsruhe

**Elektron-Spin-Resonanzen in bestrahlten Bakteriophagen
und deren Bestandteilen**

I. Mitteilung

Von

Karl G. Zimmer, Wolfgang Köhnlein, Gerhart Hotz und Adolf Müller

Mit 14 Abbildungen

Einleitung

Die Einwirkung von Strahlung auf biologisches Material gewinnt in immer steigendem Maße an praktischer Bedeutung. Neben die Strahlentherapie traten Anwendungsmöglichkeiten zur Sterilisation von medizinischen Geräten und von Medikamenten. Die Verwendung von Strahlungen zur Konservierung von Lebensmitteln wird eingehend erprobt, und umfangreiche Versuche sind auf Verbesserung von Saatgut durch strahleninduzierte Mutationen wie auch auf Ertragssteigerung durch Bestrahlung gerichtet. Mit diesen und anderen mehr industriellen Anwendungen hat die Atomtechnik auch zahlreiche Probleme des Strahlenschutzes sehr wichtig werden lassen und uns vor die Aufgabe gestellt, „mit der Strahlung leben“ zu lernen.

Damit gewann die Strahlenbiologie stark an Interesse; denn es liegt auf der Hand, daß viele der praktischen Probleme leichter zu lösen wären, wenn man aus theoretischen Untersuchungen ein besseres Bild von den wesentlichen Mechanismen der biologischen Strahlenwirkung hätte. Hinsichtlich der Notwendigkeit solcher Arbeit bestehen ebensowenig Zweifel wie über das Ziel: Gewinnung möglichst allgemeingültiger Aussagen. Über die besten Wege zur Erreichung dieses Zieles sind die Meinungen durchaus geteilt. Gerade diese Verschiedenheit der Meinungen möchten wir aber, das sei hier hervorgehoben, für einen sehr glücklichen Umstand halten. Die Aufgaben sind so wichtig und dringend, daß die parallele und gleichzeitige Verfolgung vieler möglicher Wege durchaus keine Verschwendung darstellt, sondern vielmehr dringend geboten erscheint.

Neben genetischen, physiologischen, morphologischen und zytochemischen Untersuchungen (um nur einige Richtungen der Forschung zu nennen) erscheint neuerdings die lange Jahre wenig intensiv betriebene Untersuchung der physikochemischen Prozesse wieder aussichtsreich, die sich unmittelbar an den physikalischen Vorgang der Absorption ionisierender Strahlung in biologischem Material anschließen. Dies deshalb, weil wir seit einiger Zeit mit dem Verfahren der

Elektron-Spin-Resonanz-Messung über eine vielversprechende Methode zur Untersuchung solcher Vorgänge verfügen. Nach einleitenden Versuchen von *Combrisson* und *Uebersfeld* (1954) und eingehenden Experimenten von *Gordy*, *Ard* und *Shields* (1955) an Biochemikalien konnten *Zimmer*, *Ehrenberg* und *Ehrenberg* (1957) erstmalig das Auftreten von Spin-Resonanz-Absorption nach Röntgenbestrahlung in biologischen Objekten nachweisen und in der gleichen Arbeit eine Reihe von Gesetzmäßigkeiten und Erscheinungen aufzeigen, die sich in späteren Untersuchungen als weitgehend allgemein gültig erwiesen haben.

Problemstellung

Wegen der erwähnten allgemeinen Gültigkeit der gleich anfangs festgestellten Befunde bedarf es hier keiner detaillierten Abhandlung der seither erschienenen etwa 100 Arbeiten zum gleichen Thema. Man kann sich einen guten Überblick über die für die Strahlenbiologie wesentlichen Ergebnisse verschaffen, indem man eine (verhältnismäßig kleine) Reihe von Thesen aufstellt und dabei jeweils die diese Thesen belegenden Arbeiten als Liste aufführt. Die Ergebnisse auf Nachbargebieten, wie Festkörperphysik und Festkörperchemie, müssen und können in unserem Zusammenhang unberücksichtigt bleiben, so interessant und wichtig sie im einzelnen sein mögen. Besonderer Hervorhebung und sorgfältiger Analyse bedürfen jedoch die verschiedenen Unklarheiten und offenen Probleme, die sich aus einer kritischen Sichtung des erarbeiteten Materials ergeben. Davon wird später eingehend die Rede sein; denn hier liegen die Ansatzpunkte für weitere Arbeit.

Die bisher vorliegenden Ergebnisse können zweckmäßig in folgenden Punkten zusammengefaßt werden:

1. *Ionisierende Strahlung erzeugt in biologisch wichtigen Substanzen (Biochemikalien) Zentren mit paramagnetischer Resonanzabsorption, die auf Grund ihrer Eigenschaften in der Mehrzahl der Fälle als freie Radikale anzusehen sind.* Vergleiche: *Blumenfeld* und *Kalmanson* 1957, 1958, 1961, *Boag* und *Müller* 1959 a, 1959 b, *Box* und *Freund* 1959, *Box*, *Freund* und *Lilja* 1961, *Combrisson* und *Uebersfeld* 1954, *Dorlet*, *van de Vorst* und *Bertinchamps* 1962, *Duchesne* und *Depireux* 1962, *Ehrenberg*, *Ehrenberg* und *Zimmer* 1957, *Fränz* und *Randolph* 1963, *Gordy* 1958, 1959, *Gordy*, *Ard* und *Shields* 1955 a, 1955 b, *Gordy* und *Rexroad* 1961, *Gordy* und *Shields* 1958, 1960, 1961, *Henriksen* 1961, 1962 a, 1962 b, 1962 d, *Henriksen* und *Pihl* 1960, *Kalmanson* und *Blumenfeld* 1958, *Katayama* und *Gordy* 1961, *Kirby-Smith* und *Randolph* 1960, *Koch* und *Fränz* 1963, *Koch*, *Fränz* und *Markau* 1961, *Köhnlein* 1962, *Köhnlein* und *Müller* 1962, *Kurita* 1962, *Kurita* und *Gordy* 1961 a, 1961 b, *McCormick* und *Gordy* 1958, *Miyagawa* und *Gordy* 1960, *Müller* 1962a, 1962b, 1963a, *Pohlit*, *Rajewsky* und *Redhardt* 1961, *Prydz* und *Henriksen* 1961, *Pulatova* 1962, *Pulatova*, *Rogulenkova* und *Kajushin* 1961, *Rajewsky* und *Redhardt* 1962, 1963, *Randolph* 1961, *Randolph* und *Parrish* 1958, *Rexroad* und *Gordy* 1959, *Rotblat* und *Simmons* 1963, *Schirmer* und *Sommermeyer* 1962, *Shen*, *Blumenfeld*, *Kalmanson* und *Pasynskii* 1959, *Shields* und *Gordy* 1958, 1959, *Simmons* 1962, *Sommermeyer* und *Schirmer* 1963, *Usatyi* und *Lasurkin* 1962, *van de Vorst*, *van der Kaa*, *Depireux*, *Duchesne* und *Bertinchamps* 1960, *Zimmer* 1959.

2. *Ionisierende Strahlung erzeugt in lebendem Material Zentren mit paramagnetischer Resonanzabsorption, die auf Grund ihrer Eigenschaften in der Mehrzahl der Fälle als freie Radikale anzusehen sind.* Vergleiche: *Conger* 1961, *Conger* und *Randolph* 1959, *Ehrenberg* 1961, *Ehrenberg* und *Ehrenberg* 1958, *Ehrenberg* und *Zimmer* 1956, *Fairbanks* 1957, *Klingmüller* und *Sazena* 1959, *Müller* 1963 a, *Müller* und *Zimmer* 1959, 1961, *Powers* 1961 a, 1961 b, *Powers*, *Ehret* und *Smaller* 1961, *Powers*, *Webb*

und Ehret 1960, Randolph und Haber 1961, Singh, Venkateraman, Notani und Bora 1963, Smaller und Avery 1959, Zimmer 1959, 1961, 1962 a, Zimmer, Ehrenberg und Ehrenberg 1957.

3. Die Konzentration der strahleninduzierten paramagnetischen Zentren wächst mit steigender Dosis. Vergleiche: Conger und Randolph 1959, Ehrenberg und Ehrenberg 1958, Henriksen 1961, 1962 a, Henriksen und Pihl 1960, Kirby-Smith und Randolph 1961, Köhnlein 1962, Müller 1962 a, 1962 b, 1963 a, 1963 b, Müller und Zimmer 1959, 1961, Prydz und Henriksen 1961, Rajewsky und Redhardt 1962, Randolph und Haber 1961, Rotblat und Simmons 1963, Schirmer und Sommermeyer 1962, Zimmer 1959, 1961, 1962 a, Zimmer, Ehrenberg und Ehrenberg 1957.

4. Die Konzentration der meßbaren strahleninduzierten paramagnetischen Zentren hängt vom umgebenden Gas, von der Temperatur und vom Wassergehalt der Probe ab. Vergleiche: Conger 1963, Conger und Randolph 1959, Duchesne und Depireux 1962, Ehrenberg und Ehrenberg 1958, Ehret, Smaller, Powers und Webb 1960, Henriksen 1962 c, 1963, Kirby-Smith und Randolph 1961, Klingmüller 1961 a, 1961 b, 1961 c, Müller 1962 a, 1962 b, Müller und Zimmer 1959, 1961, Patten und Gordy 1960, Powers 1961 a, 1961 b, Powers, Ehret und Smaller 1961, Powers, Webb und Ehret 1960, Randolph und Haber 1961, Sparrman, Ehrenberg und Ehrenberg 1959, Zimmer 1959, 1961, 1962 a, 1962 b, Zimmer, Ehrenberg und Ehrenberg 1957.

5. Die Konzentration der meßbaren strahleninduzierten paramagnetischen Zentren nimmt nach der Bestrahlung oft verhältnismäßig langsam ab und ist je nach untersuchtem Material und nach den Nebenbedingungen (Gas, Temperatur, Wassergehalt) noch nach Zeiten von Minuten bis zu vielen Stunden gut feststellbar. Vergleiche: Blumenfeld und Kalmanson 1961, Conger 1961, Conger und Randolph 1959, Ehrenberg 1961, Ehrenberg und Ehrenberg 1958, Ehrenberg, Ehrenberg und Zimmer 1957, Ehret, Smaller, Powers und Webb 1960, Eidus und Kajushin 1960, Gordy, Ard und Shields 1958, Henriksen 1961, 1962 a, Henriksen und Pihl 1960, Kirby-Smith und Randolph 1960, 1961, Köhnlein 1962, Müller 1963, Müller und Zimmer 1959, 1961, Powers 1961 a, 1961 b, Powers, Ehret und Smaller 1961, Powers, Webb und Ehret 1960, Prydz und Henriksen 1961, Randolph 1961, Randolph und Haber 1961, Zimmer 1959, 1961, 1962 a, Zimmer, Ehrenberg und Ehrenberg 1957.

6. Die vorher weit verbreitete Ansicht, daß Strahlenabsorption in biologischem Material allgemein innerhalb von Mikrosekunden zu neuen, im physikalischen Sinne stabilen Zuständen führt, muß nach diesen Ergebnissen aufgegeben werden (vgl. These 5).

7. Es wurde in einigen Fällen nachgewiesen, daß molekulare Wechselwirkungen verschiedener Art zwischen Strahlenschutzstoffen und zu schützendem Material eintreten und eine wesentliche Rolle für die Schutzwirkung spielen. Vergleiche: Alexander, Lett und Ormerod 1961, Blumenfeld und Kalmanson 1958, 1961, Conger 1963, Ehrenberg und Zimmer 1956, Ehret, Smaller, Powers und Webb 1960, Fairbanks 1957, Gordy, Ard und Shields 1955 a, 1955 b, Gordy und Miyagawa 1960, Henriksen und Pihl 1961, Henriksen, Sanner und Pihl 1963, Kirby-Smith und Randolph 1961, Libby, Ormerod, Charlesby und Alexander 1961 a, 1961 b, Müller im Druck, Müller und Zimmer 1959, Nielsen und Rasmussen 1962, Norman und Ginoza 1958, Patten und Gordy 1960, Powers 1961 a, 1961 b, Powers, Ehret und Smaller 1961, Powers, Webb und Ehret 1960, Randolph und Haber 1961, Rajewsky und Redhardt 1962, 1963, Smaller und Avery 1959, Sparrman, Ehrenberg und Ehrenberg 1959, Zimmer 1961, 1962 a.

Die Thesen 1 bis 6 folgten, wie oben erwähnt, bereits aus der Arbeit von Zimmer, Ehrenberg und Ehrenberg (1957), die These 7 aus den Arbeiten von Gordy, Ard und Shields (1955) sowie Ehrenberg und Zimmer (1956). Durch die zeitlich anschließenden Arbeiten wurden diese Thesen erheblich gestützt. Man könnte daher versucht sein, die Bedeutung der Zentren paramagnetischer Resonanzabsorption (strahleninduzierter freier Radikale) für hinreichend geklärt und eine weitere Beschäftigung mit diesem Arbeitsgebiet für wenig aussichtsreich zu halten. Die wahre Sachlage ist jedoch ganz anders, wie die Analyse

einiger bestehender Unklarheiten und möglicher Einwände gegen die Bedeutung strahleninduzierter Zentren paramagnetischer Resonanzabsorption für die Strahlenbiologie sofort zeigt.

a) Obwohl, wie in den Thesen 1 und 2 bemerkt, die strahleninduzierten Zentren paramagnetischer Resonanzabsorption auf Grund ihrer Eigenschaften in der Mehrzahl der Fälle als freie Radikale anzusehen sind, wäre eine klare Abgrenzung gegen andere Möglichkeiten, wie etwa F-Zentren oder langlebige Triplettzustände, erwünscht. Zu beachten ist jedoch, daß Veränderungen dieser Art für die Strahlenbiologie wahrscheinlich ebenso wichtig wären wie freie Radikale, so daß man das Problem fast als Nomenklaturfrage ansehen könnte.

b) Der Nachweis einer Erzeugung von Zentren paramagnetischer Absorption bei Bestrahlung biologischer Objekte ermöglicht noch keine Abschätzung von deren Wichtigkeit für den Wirkungsmechanismus. Ehe man die Bedeutung der strahleninduzierten paramagnetischen Zentren für das Zustandekommen strahlenbiologischer Effekte festlegen kann, sind quantitative Messungen über die Energieausbeute bei der Bildung der Zentren durchzuführen, d. h., es ist zu klären, ob je Dosisinheit (absorbierte Strahlenenergie pro g bestrahltes Material) so viele Zentren gebildet werden, daß deren Rolle als Zwischenglied zwischen Strahlenabsorption und beobachtetem biologischem Effekt nicht von vornherein ausgeschlossen ist.

c) Man kann sich vorstellen, daß zwar durch ionisierende Strahlung Zentren paramagnetischer Absorption in genügender Zahl gebildet werden, jedoch in solchen Bestandteilen oder Strukturen der biologischen Objekte, die kaum im Zusammenhang mit der untersuchten Strahlenwirkung stehen können. Es ist daher an geeigneten Objekten zu zeigen, daß paramagnetische Zentren mit genügender Ausbeute pro Dosisinheit in solchen Bestandteilen der bestrahlten Objekte gebildet werden, die für den untersuchten biologischen Effekt wichtig sind.

d) Die Thesen 1 bis 7 wurden aus Versuchen an weitgehend trockenen oder tiefgefrorenen Systemen abgeleitet, also an Systemen, bei denen Diffusionsvorgänge stark verlangsamt oder ausgeschlossen waren. Dieser Zustand liegt bei den meisten biologischen Objekten bekanntlich nicht vor. Zur Gewinnung wirklich allgemeingültiger Gesetzmäßigkeiten sind Versuche unter Bedingungen nötig, bei denen die Diffusionsvorgänge in „normaler Weise“ erfolgen können. Hierbei ist jedoch zu beachten, daß bei Vorliegen von Diffusion viele Reaktionen schneller ablaufen und daher schwerer meßbar sein dürften. In erster Annäherung wird man gleiche Bildung von Zentren paramagnetischer Resonanzabsorption bei Bestrahlung von Systemen mit und ohne Diffusion erwarten. Diese Überlegung vermindert jedoch nicht die Notwendigkeit der Durchführung entsprechender Versuche.

Die Fragen a bis d sind uns ebensolange bekannt wie die Thesen 1 bis 7; einige Betrachtungen hierzu wurden von *Zimmer* (1959) angestellt. Die Frage a führt tief in Probleme der Festkörperphysik und soll hier unerörtert bleiben, zumal sie im Vergleich zu den Fragen b bis d für die Strahlenbiologie vorerst weniger wichtig scheint. Die Frage c kann in gewissem Umfang umgangen werden, indem man die Umgebungsfaktoren während der Bestrahlung variiert, paramagnetische Resonanzabsorption und biologischen Effekt an gleich bestrahltem Material untersucht und gegebenenfalls durch Aufzeigen einer Korrelation die Bedeutung der strahleninduzierten paramagnetischen Zentren für den

strahlenbiologischen Effekt wahrscheinlich macht (vgl. *Zimmer*, 1959; *Atwood*, 1959).

Zu überzeugenderen Ergebnissen führt jedoch eine Bearbeitung der Fragen b bis d durch direkte experimentelle Untersuchungen an geeigneten Objekten. Solche Untersuchungen haben uns während der letzten Jahre beschäftigt. Sie sind experimentell sehr schwierig und zeitraubend. Für die quantitativen Ausbeutemessungen waren viele der apparativen Voraussetzungen erst zu entwickeln. Als geeignetes „lebendes Objekt“ erwiesen sich Bakteriophagen, deren Bestandteile recht gut bekannt und sicherlich besser trennbar sind als zum Beispiel die Bestandteile von Pflanzensamen, deren „Reindarstellung“ und getrennte Untersuchung im gleichen Zusammenhang durch Sektion (*Klingmüller* u. *Saxena*, 1959) und durch biochemische Fraktionierung (*Conger* u. *Randolph*, 1959) ausgeführt wurde. Wählt man etwa die Inaktivierung von Bakteriophagen durch Strahlen als zu untersuchende biologische Reaktion, so wird man sich für die strahleninduzierten paramagnetischen Zentren in der Nukleinsäure speziell interessieren, da diese nach den Ergebnissen der Phagenforschung für die Aktivität oder Inaktivität von Phagen von besonderer Bedeutung ist. Die Nukleinsäure vieler Phagen ist vom Eiweiß relativ leicht und rein abtrennbar. Aber auch hier ergaben sich technisch-experimentelle Probleme durch die Notwendigkeit der Darstellung verhältnismäßig großer Substanzmengen (Größenordnung 10 bis 50 mg oder 10^{14} Individuen) für jede Einzelmessung.

Mit diesen Ausführungen sind die unseren Untersuchungen zugrunde liegenden Probleme bereits charakterisiert: Quantitative und qualitative Messungen über die Erzeugung von Zentren paramagnetischer Absorption in Bakteriophagen und deren Bestandteilen durch ionisierende Strahlung mit dem Ziel einer Prüfung, ob die Bildung dieser Zentren einen wesentlichen Reaktionsschritt bei der Phageninaktivierung durch Bestrahlung darstellt. In der vorliegenden I. Mitteilung wird über Methoden zur Aufnahme und quantitativen Auswertung von Spektren der paramagnetischen Resonanzabsorption, über die Absolut-Eichung der Apparatur sowie über Ausbeutemessungen an bestrahlten Aminosäuren berichtet. In späteren Mitteilungen werden Messungen an Nukleinsäurebestandteilen, an Phagen-Nukleinsäure und Phagenprotein sowie an ganzen Phagen beschrieben werden.

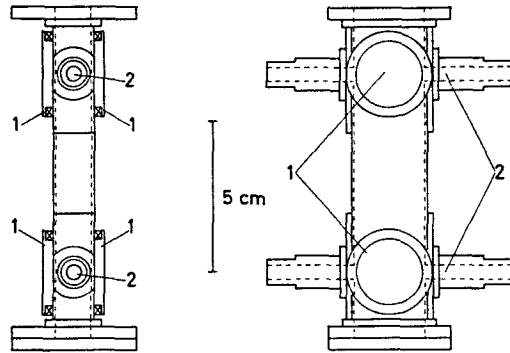
Methoden zur Aufnahme quantitativ auswertbarer Mikrowellen-Absorptionsspektren

Bezüglich des Wesens und der Technik der Mikrowellenspektroskopie im allgemeinen sei auf die Bücher von *Ingram* (1956, 1958) und zur kurzen Einführung auf die Arbeiten von *Zimmer*, *Ehrenberg* und *Ehrenberg* (1957) und von *Androes* und *Calvin* (1962) verwiesen. Die Hauptschwierigkeit bei der uns hier im Zusammenhang mit Frage b interessierenden Absolutbestimmung der Konzentration paramagnetischer Absorptionszentren (Spinkonzentration) ist vor allem darin zu suchen, daß verschiedene Proben infolge ihrer unterschiedlichen dielektrischen Eigenschaften verschiedene Rückwirkung auf das Mikrowellenspektrometer haben. In erster Linie werden die Güte und die Resonanzfrequenz des verwendeten Hohlraums beeinflusst und dadurch mittelbar auch der Klystronzillator, das Stehwellenverhältnis und die Empfindlichkeit der Anordnung. So kann es sein, daß zwei verschiedene Proben mit gleichen Spinkonzentrationen unter identischen Spektrometereinstellungen verschieden große

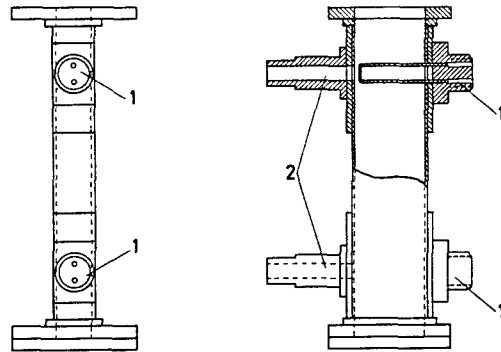
Resonanzspektren ergeben, weil sich die Empfindlichkeit der Apparatur geändert hat. Die nächstliegende Methode, die zu messende Probe gegen eine Eichsubstanz bekannter Spinkonzentration auszutauschen, führt daher oft zu einer fehlerhaften Messung. Um die erwähnten Fehlerquellen zu eliminieren, wurden mehrere zum Teil recht komplizierte Verfahren vorgeschlagen. So versuchten *Ehrenberg* und *Ehrenberg* (1958), durch Messungen von Proben verschiedener Masse und anschließende Extrapolation auf die Masse Null die erwähnten Fehlerquellen zu umgehen. Diese Methode ist zeitraubend, und außerdem wird mit kleiner werdender Spinkonzentration auch die Meßgenauigkeit geringer. Bei einer anderen Methode bringt man Standardprobe und zu messende Probe zusammen an der gleichen Stelle im Hohlraum an. Damit ist sichergestellt, daß die Spektren der beiden Proben unter identischen experimentellen Bedingungen aufgenommen werden. Doch hat diese Methode auch einen Nachteil. Da die meisten in unserem Zusammenhang interessierenden Stoffe Elektronenresonanzabsorption bei einem Magnetfeld entsprechend einem g -Wert von $g = 2$, nämlich dem des freien Elektrons, haben, überlappen sich die Spektren und sind nicht leicht zu trennen. In einem von *Singer* (1959) vorgeschlagenen Verfahren wird die Spinkonzentration einer Probe folgendermaßen bestimmt: Ein kleiner synthetischer Rubinkristall, in dessen Gitter die paramagnetischen Cr^{3+} -Ionen eingebaut sind, dient als Sekundärstandard. Dieser Kristall wird so in dem Hohlraum befestigt, daß er sich in einem Maximum der magnetischen Mikrowellenfeldstärke (H_1) befindet. Bei entsprechender Orientierung der Kristallachsen zum angelegten Magnetfeld erhält man das Resonanzsignal von Rubin bei einem g -Wert, der verschieden ist von $g = 2$, dem g -Wert der meisten freien Radikale. Das Signal einer Eichsubstanz wird nun zusammen mit dem des Rubin aufgenommen, danach werden Eichsubstanz und zu messende Probe vertauscht und die Spektren registriert. Eine Änderung der Empfindlichkeit der Apparatur macht sich in einer Änderung der Signalamplitude des Rubinkristalls bemerkbar und kann entsprechend berücksichtigt werden. Sehr ähnlich dem eben beschriebenen Verfahren ist die Methode von *Molin*, *Korickij* und *Semenov* (1960). Hier werden als Bezugssubstanzen für die Messung der Spinkonzentration Einkristalle des $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ verwendet. Durch verschiedene Orientierung der Kristallachsen zum magnetischen Gleichfeld wird erreicht, daß sich die Spektren von Bezugs- und Eichsubstanz nicht überlagern. An den Ort der Eichsubstanz bringt man die zu messende Probe und bestimmt so die Radikalkonzentration. Diese Methode ist nicht mehr anwendbar, wenn das Spektrum der Probe breiter als 200 Gauß ist, da sich dann die Spektren überlagern. Analog den zuletzt erwähnten Verfahren verwendet *von Foerster* (1960) zur Bestimmung der Spinkonzentration als Eich- und Bezugssubstanz kleine Diphenylpicrylhydrazyl-Kristalle.

Weiter gibt es die Möglichkeit, auf Eichsubstanz und Bezugssubstanz zu verzichten und die Bestimmung der Anzahl der paramagnetischen Zentren auf die Messung elektrischer Größen zurückzuführen. In der von *Yariv* und *Gordon* (1961) diskutierten Methode ergibt sich die Anzahl der Spins durch Messung der Reflexionskoeffizienten des Reflexionshohlraums, der die Probe enthält, im Resonanzfall und außerhalb der Resonanz. Diese Methode setzt noch die Kenntnis weiterer Größen (des Füllfaktors, der Güte des Hohlraums, der Resonanzfrequenz, der Modulationsamplitude und der Quantenzahlen für den betrach-

Abb. 1. Doppelhohlraum für 400 Hz und für 100 kHz. 1. Modulationsspulen bzw. Modulationsschleife. 2. Bohrungen zur Einführung der Proben.



Doppelhohlraum für 400 Hz



Doppelhohlraum für 100 kHz

teten Übergang) voraus. Sie ist nur anwendbar, wenn das zu untersuchende Spektrum einer Lorentzverteilung folgt und ein Einlinienspektrum ist.

Um die erwähnten Schwierigkeiten der beschriebenen Methoden zu vermeiden, wurde eine neue Anordnung zur Vergleichsmessung von Spinkonzentrationen entwickelt (Köhnlein u. Müller, 1960, 1961). Der wesentliche Bestandteil ist ein Doppelhohlraum, in dem zwei Proben gleichzeitig untergebracht werden können. Zur Ausschaltung von Fehlern sind die beiden Löcherpaare für die Einführung der Proben symmetrisch an zwei Bäuchen des Mikrowellenmagnetfeldes (H_1) im Hohlraum angebracht (Abb. 1). Der Hohlraum hat einen rechteckigen Querschnitt und wird in der Wellenform H_{105} erregt. Er hat die Länge von 5 Halbwellen. Beide Proben befinden sich je eine halbe Wellenlänge von den Enden entfernt. Der Hohlraum arbeitet in Reflexion und ist unsymmetrisch mit einem Loch in der Mitte einer seiner Endflächen an den energiezuführenden Wellenleiter angekoppelt. Bei den Messungen wurde ein kommerzielles Mikrowellenspektrometer der Firma Varian Associates (Palo Alto) verwendet, das bei einer Frequenz von 9500 MHz arbeitet; jedoch an Stelle des Varian-Hohlraumresonators wurde der oben beschriebene Doppelhohlraum benutzt. Das Spektrometer arbeitet wahlweise mit Tonfrequenzmodulation oder mit 100-kHz-Modulation des Magnetfeldes und anschließender selektiver Verstärkung der mit dieser Frequenz modulierten Mikrowellenabsorption. Zur Tonfrequenzmodulation dienen die am Ort der Proben auf dem Doppelhohlraum angebrachten Spulen-

paare. Für die 100-kHz-Modulation des Magnetfeldes ersetzen wir die Modulationsspulen durch eine Modulationsschleife im Inneren des Hohlraums in einer Anordnung, wie sie von Ingram (1958) beschrieben wurde. Um auch große Modulationsamplituden zu erhalten, wurden die aus nur einer Windung bestehenden Spulen durch eine Leitung mit möglichst geringer Induktivität gespeist, die durch Aufeinanderkleben von 10 mm breiten Kupferfolien mit dazwischen liegender Kunststoffolie zur Isolation hergestellt war. Die Leitung wurde durch einen vom Röhrengenerator gespeisten Ferritkerntransformator mit 200 Primär- und nur einer Sekundärwindung mit Energie versorgt.

Mit dieser Anordnung ergab sich eine maximale Modulationsamplitude von 25 Gauß. Damit sich die Spektren der beiden Proben nicht überlagern, wird zunächst am Ort der einen Probe das Magnetfeld moduliert und das Spektrum aufgenommen, dann am Ort der anderen Probe. Bei einem maximalen Modulationshub von 15 bzw. 25 Gauß konnte kein Einfluß der Modulation der einen auf die jeweils andere Probe festgestellt werden. Um zu prüfen, wie sich eine Änderung von Güte und Resonanzfrequenz des Doppelhohlraums auswirkt, wurde folgendes Experiment durchgeführt: Die Signale von zwei etwa gleichen Proben von Diphenylpicrylhydrazyl wurden aufgezeichnet. Dann wurde einer Probe etwas Wasser hinzugefügt, jedoch durch Einschließen des Wassers in einen winzigen Nylonschlauch ein direkter Kontakt von Wasser und DPPH vermieden. Dadurch wurde nicht nur das Signal von dieser Probe, sondern auch das von der Vergleichsprobe herrührende in gleichem Maße verkleinert. Sollten die Proben nicht im gleichen H_1 -Feld sein, so kann durch Vertauschen dieser Geometrie ein Einfluß eliminiert werden. Neben praktischen Vorteilen, wie schnelle und zuverlässige Registrierung der Spektren ohne Veränderung am Mikrowellenteil der Apparatur, hat diese Methode gegenüber älteren den prinzipiellen Vorzug, daß sie es ermöglicht, Proben mit beliebig breiten Spektren ohne Rücksicht auf die Kurvenform ebenso wie Proben mit merklicher Mikrowellenabsorption, insbesondere auch wasserhaltige, exakt miteinander zu vergleichen.

Verfahren zur quantitativen Auswertung von Mikrowellen-Absorptionsspektren

Nach Ingram (1958) ist die Fläche unter dem Absorptionssignal ein Maß für die Anzahl der ungepaarten Elektronen. Durch Vergleich der entsprechenden Flächen von Standard und Probe erhält man die Anzahl der Radikale in der Probe relativ zum Standard. Nun wird aber bei empfindlichen Mikrowellenspektrometern infolge der Magnetfeldmodulation und schmalbandiger Verstärkung nicht das Absorptionssignal $g(H)$ selbst, sondern die erste Ableitung des Signals $g'(H)$ aufgezeichnet. Um die gewünschte Fläche zu erhalten, muß zweimal integriert werden. Die Integrationen können selbstverständlich graphisch oder numerisch durchgeführt werden. Doch sind diese Methoden sehr zeitraubend. Eine Vereinfachung bedeutet ein halb mechanischer, halb elektronischer Analogintegrator von Schwenker (1959), der die erste Integration ausführt und die Absorptionskurve $g(H)$ liefert. Die Größe der Fläche unter $g(H)$ kann zum Beispiel durch Ausschneiden und Abwiegen bestimmt werden. Erschwerend für quantitative Auswertung der Spektren ist die auftretende Drift. Die Absorptionskurve $g(H)$ beginnt bei $g(H) = 0$ und endet bei Werten $g(H) \neq 0$, so daß die Bestimmung der Fläche schwierig und nur unter Zuhilfenahme von Korrekturen möglich ist. Eine weitere Verbesserung bringt die von Randolph (1960) beschriebene vollelektronische Anordnung, die eine zweimalige Integration ausführt. Da

diese Methode im wesentlichen auf der Messung von Spannungsdifferenzen beruht, hängt die Genauigkeit sehr stark von dem Signal-Rausch-Verhältnis und der Stabilität des Endverstärkers des Spektrometers ab. Abweichungen von der Nullspannung gehen quadratisch mit der Meßzeit als Fehler in das Endergebnis ein.

Man kann jedoch das zweimalige Integrieren durch Bestimmung des ersten Moments umgehen und auf diesem Wege schnell und genau eine Aussage über die Spinkonzentration in den Proben erhalten. Es gilt:

$$\int_{-\infty}^{+\infty} g(H) dH = c N, \quad (1)$$

wenn $g(H)$ der Kurvenverlauf des Absorptionssignals in Abhängigkeit von der magnetischen Feldstärke ist. Durch partielle Integration ergibt sich:

$$\int_{-\infty}^{+\infty} g(H) dH = [g(H) H]_{-\infty}^{+\infty} - \int_{-\infty}^{+\infty} g'(H) H dH = c N, \quad (2)$$

wobei $g'(H)$ der gemessene Kurvenverlauf der ersten Ableitung ist. Der zweite Ausdruck auf der rechten Seite von Gl. (2) stellt das Moment dar. Der 1. Ausdruck verschwindet, wenn $g(H)$ einer Gauß- bzw. Lorentzverteilung folgt. Da die Spektren bestrahlter Biochemikalien Überlagerungen von Gauß- bzw. Lorentzverteilungen sind, verschwindet für sie ebenfalls $[g(H) H]$, und man erhält:

$$\left| \int_{-\infty}^{+\infty} g'(H) H dH \right| = c N. \quad (3)$$

Um auf das erste Moment zu kommen und damit zu der Radikalkonzentration, hat man nur einmal zu integrieren und verkleinert damit die möglichen Fehler.

Die Bestimmung des ersten Moments kann auf verschiedene Weise durchgeführt werden: 1. Durch numerische Auswertung, 2. mit Hilfe eines mechanischen Integrators, zum Beispiel einem Stieltjes-Planimeter (*Laurila*, 1939), und 3. mit der von *Collins* (1959) beschriebenen Anologschaltung, die $g'(H)$ mit H mit Hilfe eines Servomotors multipliziert und dann elektronisch integriert. Eine weitere einfache und sehr genaue Analogbestimmung von M_1 kann mit der Momentenwaage ausgeführt werden (*Burgess*, 1961), die aus einer empfindlichen Laborwaage leicht dadurch herzustellen ist, daß eine Waagschale durch eine starr mit dem Waagebalken verbundene Aluminiumfolie ersetzt wird (Abb. 2). Die Flächen zwischen der Kurve $g'(H)$ und der Linie $g'(H) = 0$ werden ausgeschnitten, wie Abbildung 2 zeigt, auf die Aluminiumfolie gelegt und das Moment durch Wägung bestimmt. Beim Ausschneiden der Spektren tritt häufig folgende Schwierigkeit auf: Das vom Schreiber aufgezeichnete Signal $g'(H)$ beginnt bei $g'(H) = 0$ und endet bei Werten von $g'(H) \neq 0$, so daß die Unsicherheit beim Zeichnen der Nulllinie $g'(H) = 0$ zu einem Fehler bei der nachfolgenden Momentenbestimmung führt. Dieser Fehler kann aber durch geeignete Wahl des Nullpunkts der H-Skala klein von zweiter Ordnung gemacht werden, wie folgende Betrachtung zeigt (*Collins*, 1959).

Es gilt Gl. (3). Der Fehler von $g'(H)$ sei α , H sei mit einem Fehler β behaftet. Legt man den Nullpunkt der H-Skala in den Mittelpunkt des Resonanzsignals, also auf den Nulldurchgang von $g'(H)$, so erhält man:

$$\begin{aligned} M_1 &= \int_{-a}^{+a} [g'(H) - \alpha] \cdot [H - \beta] \cdot dH \\ &= \int_{-a}^{+a} g'(H) H dH - \beta \int_{-a}^{+a} g'(H) dH - \alpha \int_{-a}^{+a} H dH + \alpha \beta \int_{-a}^{+a} dH. \end{aligned} \quad (4)$$

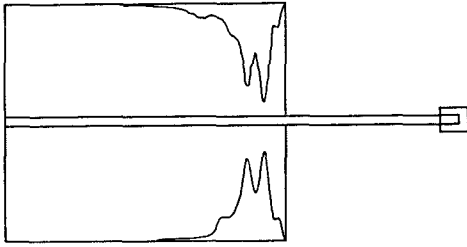
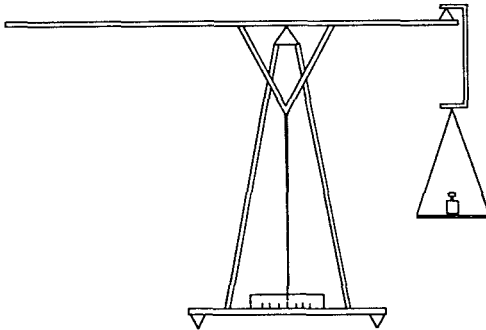


Abb. 2. Die Momentenwaage (schematisch).



Der erste Ausdruck auf der rechten Seite von Gl. (4) ist das gesuchte Moment. Der zweite Term ist 0, da $g'(H)$ an der Stelle $\pm a$ verschwindet. Der dritte Term ist ebenfalls 0. Man erhält also für den Fehler $\alpha\beta 2a$. Legt man dagegen den Nullpunkt von H nach $-a$ und integriert von 0 bis $2a$, so wird der Fehler, der von der Unsicherheit der Nulllinie herrührt, $2\alpha a^2 - 2\alpha\beta a$, also nicht mehr klein von zweiter Ordnung.

Bei der Bestimmung des Moments der aufgezeichneten Spektren wurden die Integrationsgrenzen nicht bis unendlich erstreckt, sondern nur von $-a$ bis $+a$. Dadurch entsteht ein Fehler, der für den Fall, daß $g(H)$ einer Gauß- bzw. Lorentzverteilung folgt, bestimmt wurde. In der Tabelle 1 ist das Ergebnis der Rechnung zusammengestellt. $2a$ ist das endliche Integrationsintervall, bei dem das Integral $\int g'(H) H dH$ einen bestimmten Bruchteil des bis $\pm\infty$ erstreckten Integrals erreicht. $2a$ ist in Einheiten von ΔH (Linienbreite an den Punkten maximalen Anstiegs) angegeben. Wie aus Tabelle 1 zu entnehmen ist, kann für eine Gaußverteilung leicht eine ausreichende Genauigkeit erreicht werden, während für eine Lorentzverteilung bei den für unsere Messungen gewählten Integrationsbreiten von $2a = 15 \Delta H$ eine Korrektur von 15% zu berücksichtigen ist. Die Empfindlichkeit unserer Momentenwaage beträgt 2 mg pro Skalenteil. Das Moment der ausgeschnittenen Spektren liegt zwischen 100 mg und 1 g. Das Flächengewicht des verwendeten Schreiberpapiers wurde bestimmt und genügende Homogenität sichergestellt. Die beschriebene Auswertungsmethode der experimentellen Kurven mit der Momentenwaage gestattet daher bis auf einen Fehler von etwa 5% die genaue Bestimmung von Spinkonzentrationen relativ zu einem Vergleichsstandard. Für Absolutbestimmungen ist die Kenntnis der Spinkonzentration in dem Vergleichsstandard erforderlich, von deren Bestimmung im folgenden Abschnitt die Rede ist.

Tabelle 1. Vergleich der durch Integrieren nur über verschieden breite endliche Bereiche verursachten Fehler für Mikrowellenspektren, die Gauß- oder Lorentzverteilungen folgen.

$\frac{\int_{-a}^{+a} g'(H) H dH}{\int_{-\infty}^{+\infty} g'(H) H dH}$	$2a/\Delta H$	
	Gauss	Lorentz
0,95	2,8	41,6
0,90	2,5	22,6
0,85	2,3	14,8
0,80	2,2	11,0

Wahl und Absoluteichung eines Sekundärstandards

Als Vergleichsstandard dienen Mischungen aus Anthrazitkohlepulver und Kalziumkarbonat mit verschiedenem Kohlegehalt. Für die Wahl der Anthrazitkohleprobe als Vergleichsstandard sprechen folgende Gründe: 1. Die Spinkonzentration ist unter den vorliegenden Versuchsbedingungen (Zimmertemperatur, Normalatmosphäre) über lange Zeiträume konstant. Es konnte innerhalb von zwei Jahren keine Änderung der Spinkonzentration beobachtet werden. 2. Das Resonanzsignal der Kohleprobe besteht nur aus einer Linie und zeigt keine Hyperfeinstruktur. 3. Die Kurvenform der Absorptionslinie kann in guter Übereinstimmung durch eine Lorentzverteilung dargestellt werden.

In Abbildung 3 wird das vom Kompensationsschreiber registrierte Signal einer der verwendeten Kohleproben mit der 1. Ableitung einer Lorentzver-

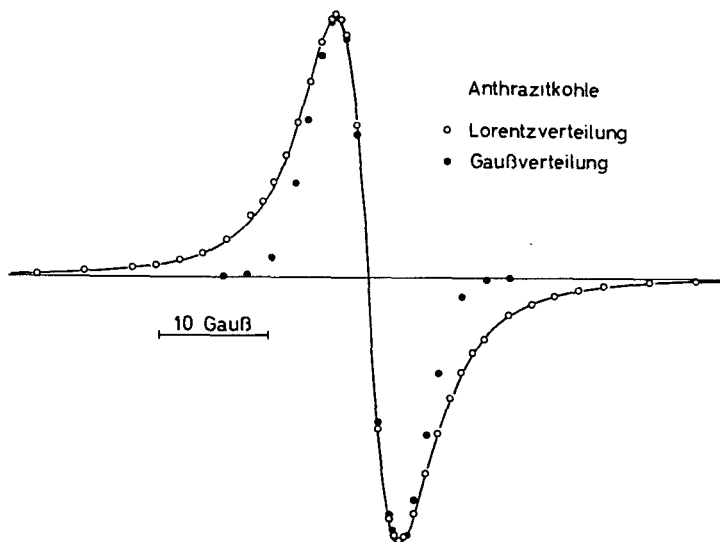


Abb. 3. Abgeleitete der paramagnetischen Resonanzabsorption von Anthrazitkohle, verglichen mit der Ableitung einer Lorentz- (○) bzw. Gaußverteilung (●) gleicher Breite und Amplitude.

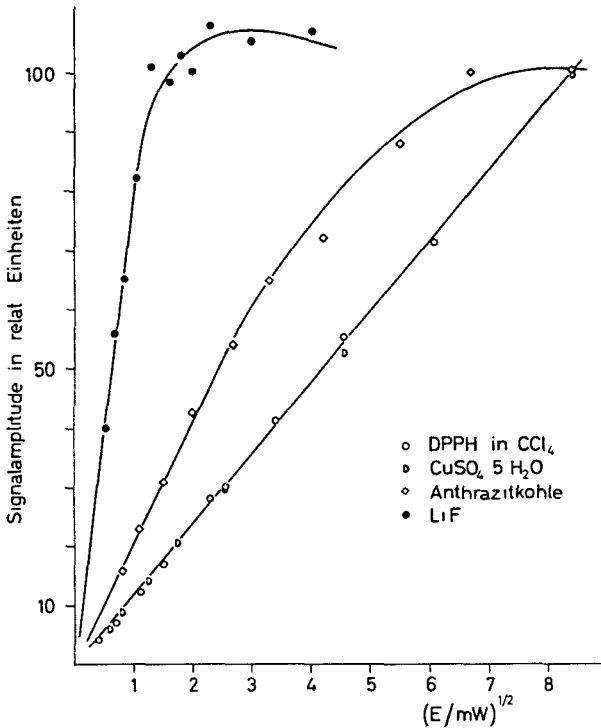


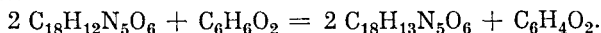
Abb. 4. Signalamplitude in Abhängigkeit von der einfallenden Mikrowellenfeldstärke für DPPH in CCl_4 , $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, Anthrazitkohle und LiF.

teilung verglichen. Der Abstand zwischen den Punkten maximaler Steigung beträgt $(6 \pm 0,2)$ Gauß und damit die Halbwertbreite etwa 10 Gauß. Untersucht man die Signalamplitude des Kohlesignals in Abhängigkeit von der Mikrowellenfeldstärke bzw. von \sqrt{E} , wobei E die zum Resonator gelangende Mikrowellenleistung ist, so erhält man das in Abbildung 4 aufgetragene Ergebnis. Daraus ergibt sich, daß bei einer Mikrowellenleistung von etwa 20 mW bereits Sättigung auftritt. Quantitative Messungen wurden daher bei kleineren Mikrowellenleistungen durchgeführt.

Zur Absolutmessung der Spinkonzentration in einem Sekundärstandard, dessen freie Spins durch freie Radikale gebildet werden, gibt es verschiedene Wege, z. B. eine Titration mit Stickoxyd. Nach Müller und Metzger (1955) verbindet sich Stickoxyd (NO) mit reaktionsfähigen freien Radikalen im Verhältnis 1:1. Auf dieser Tatsache beruht die von Ehrenberg, Ehrenberg und Löfroth (1960) beschriebene Absolutbestimmung der Radikalkonzentration in bestrahltem Material. Die Stickoxydtitration ist jedoch nicht allgemein anwendbar und kann nur bei wenigen organischen Verbindungen mit Erfolg durchgeführt werden, da spezielle Eigenschaften der Substanz erforderlich sind. So darf die Verbindung keinen Stickstoff enthalten, die Radikale müssen im Vakuum stabil sein und sofort und vollständig mit NO reagieren, und das Stickoxyd muß leicht und schnell in das Kristallgitter diffundieren können. Ehrenberg, Ehrenberg und Löfroth benutzten bestrahltes Cholesterol, das die geforderten Bedingungen erfüllt, und führten die Absolutbestimmung folgendermaßen durch: Die Reso-

nanzspektren von bestrahltem Cholesterol wurden vor und nach Zugabe einer bestimmten Menge NO registriert. Aus dem verbrauchten NO und der Änderung der Fläche unter dem Absorptionssignal konnte für eine bestimmte Spektrometereinstellung die Anzahl der Radikale pro Flächeneinheit berechnet werden. Außerdem wurde der durch die Titration im Cholesterol gebundene Stickstoff chemisch mit der Kjeldahl-Methode bestimmt. Die beiden Verfahren lieferten innerhalb der Meßgenauigkeit übereinstimmende Resultate. Selbstverständlich gibt diese Methode nur bei Verwendung von sehr reinem NO brauchbare Ergebnisse und setzt außerdem die Kenntnis des Absorptionssignals voraus. Wir verzichteten daher auf die NO-Titration und benutzten zur Messung des Radikalgehalts mehrere andere, voneinander unabhängige Meßmethoden.

1. *Eichung mit Diphenylpicrylhydrazyl.* Zunächst wurde die Spinkonzentration der Kohleprobe durch Vergleich mit einer 10^{-4} molaren Lösung von Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) in Tetrachlorkohlenstoff unter Sauerstoff bestimmt. Dazu nahmen wir die Spektren der beiden Proben unter identischen experimentellen Bedingungen mit dem Doppelhohlraum auf und verglichen anschließend die Momente. Das verhältnismäßig stabile organische Radikal DPPH wurde von der Firma Fluka (Schweiz) bezogen. Das Präparat soll theoretisch pro Molekül einen freien Spin enthalten, so daß man die Menge der freien Radikale durch Wägung bestimmen könnte. Wir hielten diesen von vielen Autoren beschrittenen Weg für nicht genügend sicher und führten 3 voneinander unabhängige Bestimmungen der Konzentration freier Radikale in unserem DPPH-Präparat durch. a) Der Radikalgehalt des Präparats wurde durch Titration mit dem Reduktionsmittel Hydrochinon bestimmt (nach *Gold Schmidt* u. *Renn*, 1922). Das Ende der Titration ist an dem Farbumschlag der DPPH-Lösung nach Gelbrot zu erkennen. Bei der Titration findet folgende chemische Reaktion statt:



b) Der Radikalgehalt des DPPH wurde auch optisch durch Messung der dekadischen Extinktion (E) bestimmt: Nach *Henglein*, *Boysen* und *Schnabel* (1960) beträgt bei $520 \text{ m}\mu$ der Extinktionskoeffizient von reinem DPPH in benzolischer Lösung $1,15 \cdot 10^4 \text{ Mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$. c) Schließlich wurde die Anzahl der ungepaarten Elektronen in DPPH durch Messen der statischen Suszeptibilität mit einer paramagnetischen Waage ermittelt.* Die statische Suszeptibilität ist direkt proportional zur Anzahl der Spins.

In Tabelle 2 ist das Ergebnis der Radikalbestimmung in DPPH nach den drei genannten Methoden a bis c zusammengestellt. Der Radikalgehalt würde

Tabelle 2. Vergleichende Bestimmung der Spinkonzentration in einem DPPH-Präparat nach verschiedenen Methoden.

Nachweismethode	Spinkonzentration, bezogen auf theoretischen Wert von 1 Spin pro Molekül
Titration mit Hydrochinon	$0,95 \pm 0,05$
Optische Extinktion	$0,945 \pm 0,03$
Paramagnetische Waage	$0,96 \pm 0,05$

* Für die Durchführung dieser Messung danken wir Herrn Dr. K. H. Hausser, Max-Planck-Institut für Medizinische Forschung, Abt. Chemie, Heidelberg.

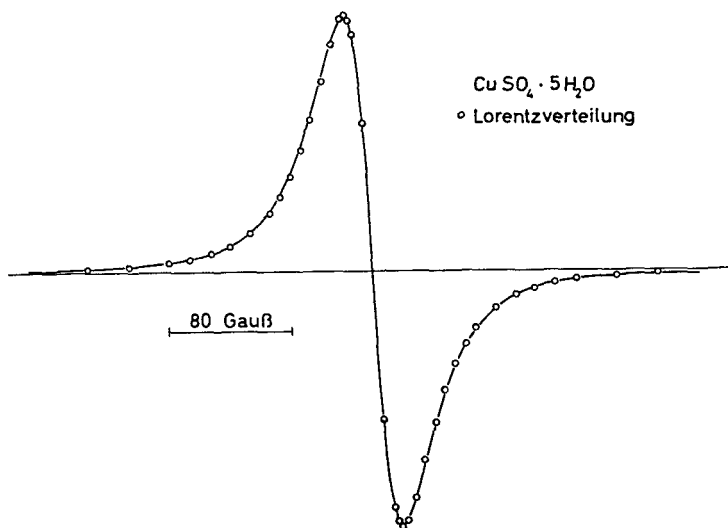


Abb. 5. Abgeleitete der paramagnetischen Resonanzabsorption von Einkristallen des $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, verglichen mit der Ableitung einer Lorentzverteilung gleicher Breite und Amplitude.

100% betragen, wenn jedes Molekül 1 ungepaartes Elektron besitzt; die drei verschiedenen Messungen lieferten in guter Übereinstimmung das Ergebnis von 95%. Mit der so festgelegten Spinkonzentration in unserem DPPH-Präparat konnten wir nach den oben beschriebenen Verfahren die Anzahl der freien Spins in der als Sekundärstandard gewählten Kohleprobe bestimmen.

2. *Eichung mit Kupfersulfat-Einkristallen.* Zweiwertige Kupferionen (Cu^{++}) haben in der M-Schale ein ungepaartes 3d-Elektron, sind also paramagnetisch. Unter Voraussetzung stöchiometrischer Bedingungen läßt sich aus dem Gewicht die Anzahl der ungepaarten Elektronen berechnen. Für die Eichung wurden Kupfersulfateinkristalle verwendet. Die Kristalle wurden in saurer CuSO_4 -Lösung gezüchtet und mehrmals umkristallisiert. Um bei der Eichung der Kohle gleiche Probegeometrie zu haben, wurden die CuSO_4 -Kristalle zu Stäbchen geschliffen und so zum angelegten magnetischen Feld orientiert, daß das resultierende Resonanzsignal eine Breite von (40 ± 1) Gauß an den Punkten maximaler Steigung hat. Die Kurvenform folgt im mittleren Teil des Signals sehr genau einer Lorentzverteilung (Abb. 5), nur an den äußeren Flanken liegen die gerechneten Punkte etwas über den Meßwerten. Mikrowellensättigung konnte bis zu der maximal zur Verfügung stehenden Mikrowellenleistung von etwa 70 mW nicht festgestellt werden (Abb. 4). Die Eichung der Kohleprobe wurde mit zwei verschieden großen Kupfersulfatkristallen durchgeführt. Die Anzahl der absorbierenden ungepaarten Elektronen im empfindlichen Volumen des Hohlraumresonators betrug $(1,95 \pm 0,05) \cdot 10^{20}$ bzw. $(4,05 \pm 0,1) \cdot 10^{20}$. Das Ergebnis dieser Messung ist mit dem der beiden anderen Methoden in Tabelle 3 aufgeführt.

3. *Eichung mit den F-Zentren in Lithiumfluorid.* Nach Messungen von *Portis* (1953) und *Feher* (1957) ist das F-Zentrum in Alkalihalogeniden eine Anionenlücke, die mit einem Elektron besetzt ist. Da das magnetische Moment dieses Elektrons nicht kompensiert ist, zeigen die F-Zentren paramagnetische Elek-

Tabelle 3. Vergleich der Absolut-Eichungen einer Kohleprobe nach verschiedenen Verfahren.

Verfahren der Absolutmessung der Spinkonzentration	Anzahl der Spins in Kohleprobe Nr. 2
DPPH, gegen Hydrochinon titriert	$1,05 \cdot 10^{17}$
DPPH, aus opt. Extinktion bestimmt	$1,05 \cdot 10^{17}$
DPPH, magnetisch gewogen	$1,06 \cdot 10^{17}$
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, Kristall gewogen	$1,0 \cdot 10^{17}$
L.F, F-Zentren aus opt. Extinktion bestimmt	$1,1 \cdot 10^{17}$

tronenresonanz. Außerdem sind F-Zentren optisch an ihrem charakteristischen Absorptionsspektrum nachweisbar und können auf diesem Wege quantitativ bestimmt werden. Auf der optischen und magnetischen Parallelmessung beruht die dritte Eichmethode der Kohleprobe. Die Messungen wurden an Lithiumfluorid (LiF) durchgeführt. Die LiF-Kristalle wurden von der Firma Leitz (Wetzlar) als Kristallbruch bezogen. Durch mehrmaliges Spalten konnten Kristallplättchen mit Dicken zwischen 0,16 mm und 0,40 mm hergestellt werden. Die Stärke der Kristalle wurde mit einer Mikrometerschraube auf 0,01 mm genau bestimmt.

Zur Erzeugung der Farbzentren wurden die Kristalle mit γ -Strahlung einer Co^{60} -Quelle bei einer Dosisleistung von $5,7 \cdot 10^5$ Röntgen pro Stunde bestrahlt.* Die Bestrahlungen fanden bei Zimmertemperatur statt und umfaßten stets gleichzeitig die Kristallplättchen für die optische Messung und Stäbchen (etwa 3 mm ϕ und 22 mm Länge) für die magnetische Messung. Die Strahlendosis betrug 6,5 Mr bzw. 15 Mr. Die bestrahlten Kristalle waren hellgelb verfärbt. Sowohl vor als auch unmittelbar nach Ende der Bestrahlung wurde das optische Absorptionsspektrum der LiF-Kristalle mit einem Zeiss-Spektralphotometer bei Zimmertemperatur und einer effektiven Bandbreite von $\Delta\lambda = 0,5 \text{ m}\mu$ aufgenommen. Bei unbestrahltem LiF konnte keine Absorption festgestellt werden. In Abbildung 6 sind die durch Bestrahlung entstehenden Absorptionsspektren der F-Zentren über der Wellenzahl aufgetragen. Der durch Streuung und Reflexion an den Kristallflächen entstehende Fehler bei der Extinktionsmessung konnte durch die Differenzmessung vor und nach der Bestrahlung eliminiert werden, der durch Streulicht verursachte Fehler wurde am Absorptionsmaximum zu 0,7% bestimmt.

Aus dem optischen Absorptionsspektrum wurde die Anzahl der F-Zentren nach einer von *Stöckmann* (in *Landolt-Börnstein*, 1955) angegebenen Beziehung berechnet, die Gültigkeit des Beerschen Gesetzes voraussetzt. Nach dem Beerschen Gesetz besteht eine lineare Beziehung zwischen der Extinktion und der Konzentration der absorbierenden Zentren, d. h., die Extinktion erfolgt ohne Wechselwirkung der einzelnen absorbierenden Zentren untereinander. Man wird eine solche Wechselwirkung vernachlässigen können, wenn die absorbierenden Zentren genügend weit voneinander entfernt sind. Die Ergebnisse der optischen Messungen (Mittelwerte aus Messungen an mehreren Kristallen verschiedener Dicke) liegen mit $1,16 \cdot 10^{18}$ Zentren bei 6,5 Mr und $1,45 \cdot 10^{18}$ Zen-

* Für die Benutzung der Kobaltquelle danken wir Herrn Dr. D. Schulte-Frohlinde, Laboratorium für Strahlenchemie am Kernforschungszentrum Karlsruhe.

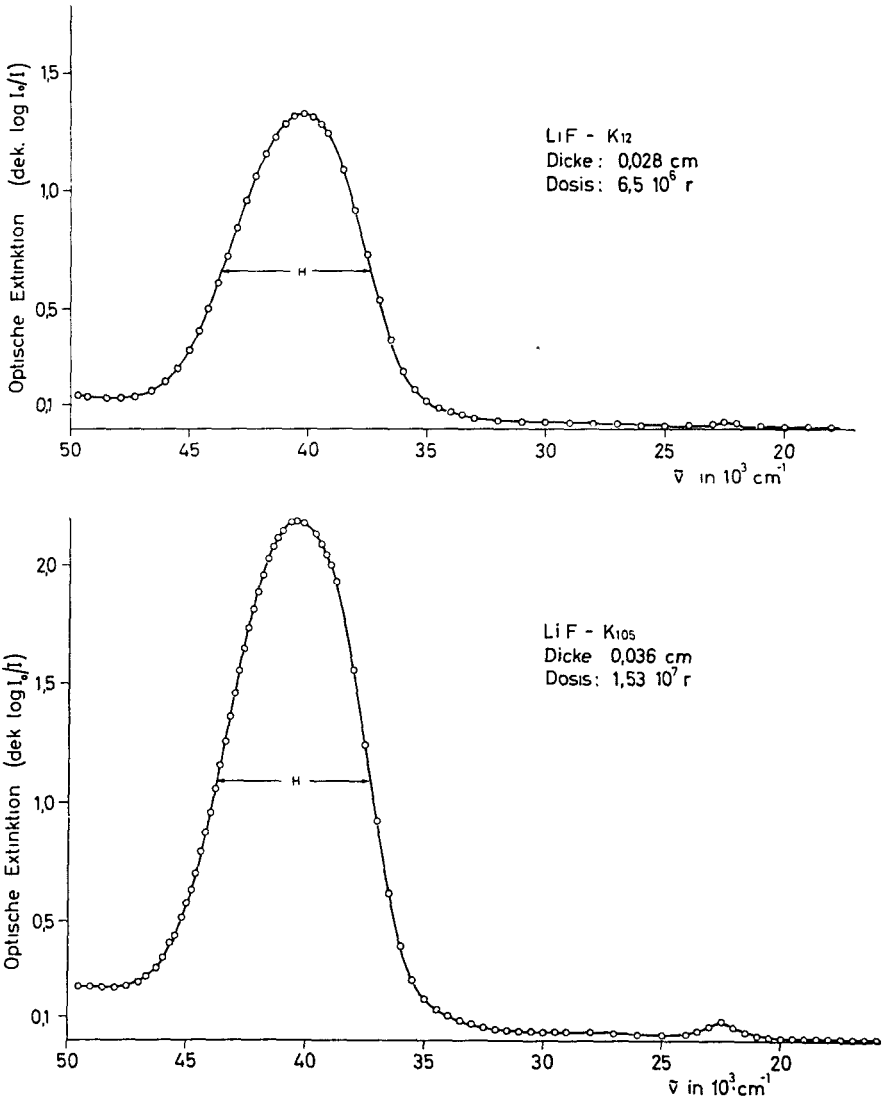
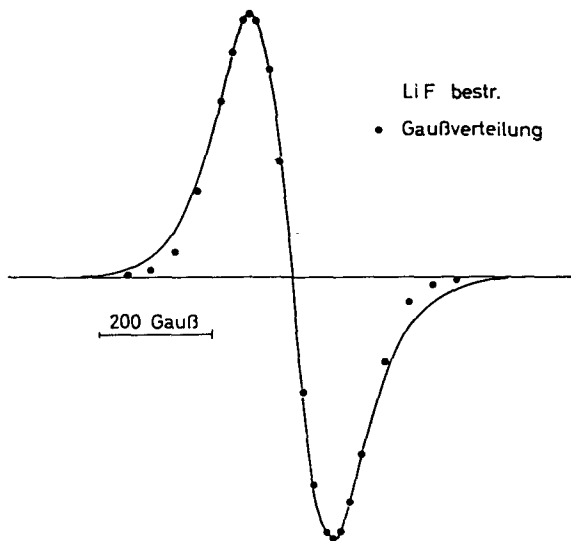


Abb. 6. Optische Extinktion in Abhängigkeit von der Wellenzahl für verschieden stark bestrahlte LiF-Kristalle.

tren bei 15,3 MR auf der von *Hyde* (1960) angegebenen Dosiseffektcurve für bestrahltes LiF. Der Meßfehler beträgt etwa 3⁰/₀.

Parallel zur optischen Bestimmung der Farbzentren liefen die Messungen am Mikrowellenspektrometer zur Eichung des Kohlestandards. Da bestrahltes LiF schon bei kleinen Mikrowellenleistungen Sättigung zeigt, in der vorliegenden Anordnung schon oberhalb 0,5 mW (Abb. 4), mußten die Messungen unterhalb dieser Grenze durchgeführt werden. In diesem Bereich ist die Empfindlichkeit des Spektrometers so gering, daß zur Verbesserung des Signal-Rausch-

Abb. 7. Abgeleitete der paramagnetischen Resonanzabsorption von bestrahltem LiF, verglichen mit der Ableitung einer Gaußverteilung gleicher Breite und Amplitude.



Verhältnisses und aus Geometriegründen die Messungen nicht an den Kristallplättchen, sondern an den identisch bestrahlten LiF-Stäbchen vorgenommen wurden. Im empfindlichen Volumen des Hohlraums befanden sich etwa $0,2 \text{ cm}^3$ LiF-Kristall. Wie bei den optischen Messungen, zeigen unbestrahlte LiF-Kristalle auch kein ESR-Spektrum. Das Resonanzsignal der bestrahlten Kristalle hat an den Stellen maximaler Steigung eine Linienbreite von (148 ± 2) Gauß. Die Kurvenform des Signals ist ähnlich einer Gaußverteilung gleicher Breite und Amplitude (Abb. 7).

Die Ergebnisse der mit den verschiedenen Eichmethoden zur Bestimmung der ungepaarten Elektronen in der Standardprobe erhaltenen Werte sind in der Tabelle 3 zusammengestellt und stimmen innerhalb der Fehlergrenzen sehr gut überein. Damit ist man in der Lage, dem Resonanzsignal einer als Sekundärstandard zu verwendenden Kohleprobe eindeutig eine bestimmte Anzahl ungepaarter Elektronen zuzuordnen und mit diesem Sekundärstandard unter Verwendung der oben beschriebenen experimentellen Verfahren Bestimmungen der Spinkonzentration in bestrahlten biologischen Materialien durchzuführen.

Bestimmung des Energieaufwands zur Erzeugung paramagnetischer Absorptionszentren in Aminosäuren durch Röntgenstrahlung

1. *Dosimetrie und Bestrahlung.* Als Strahlenquelle diente in den meisten Fällen, wegen der hohen Dosisleistung von $0,5 \text{ MR/min}$ am Ort der Probe und daher kurzen Bestrahlungszeiten, eine 100-kV -Röntgenröhre der Firma C. H. F. Müller, Hamburg, mit einem Röhrenfenster aus $1,5 \text{ mm}$ Beryllium. Die Strahlung hatte eine Halbwertschicht (HWS) von $0,065 \text{ mm}$ Aluminium und eine effektive Wellenlänge von $1,4 \text{ \AA}$. Außerdem wurde zur Überprüfung der Dosimetrie an der 100-kV -Röhre auch mit einer 150-kV -Röhre bestrahlt (HWS 6 mm Aluminium, effektive Wellenlänge $0,26 \text{ \AA}$, maximale Dosisleistung 8 kR/min). Die Bestrahlungsdosis wurde mit drei voneinander unabhängigen Methoden bestimmt: a) mit dem Fricke-Aktinometer, wobei die Messungen mit einer 1-mM -Eisensulfatlösung in $0,8$ normaler H_2SO_4 durchgeführt wurden; b) mit einer Baldwin-Farmer-Ionisationskammer, die durch The British National Physical

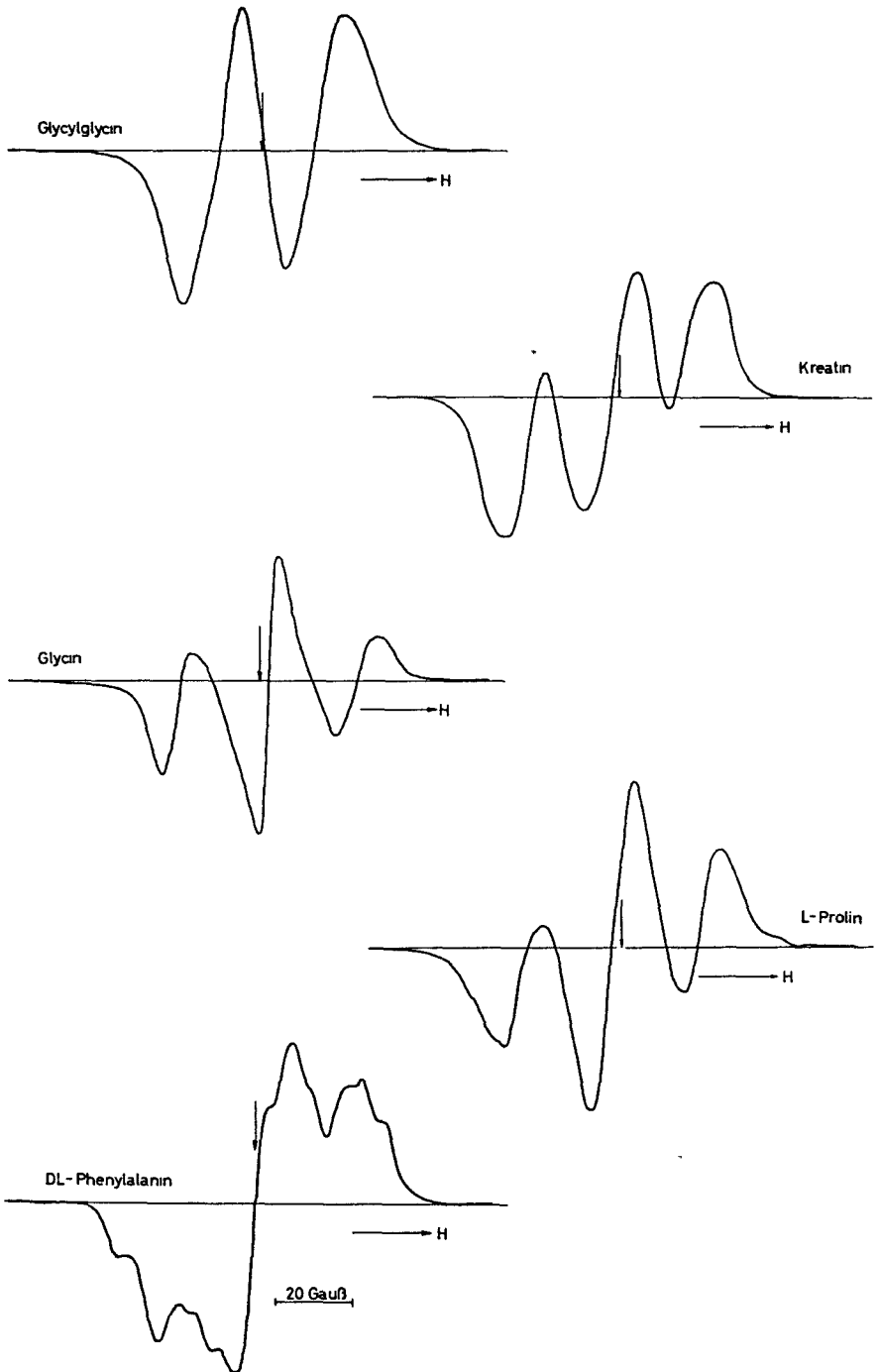


Abb. 8 a

Abb. 8 a-c. Abgeleitete der paramagnetischen Resonanzabsorption für die untersuchten Biochemikalien. Der Pfeil bezeichnet die Lage des Resonanzmaximums für das freie Elektron.

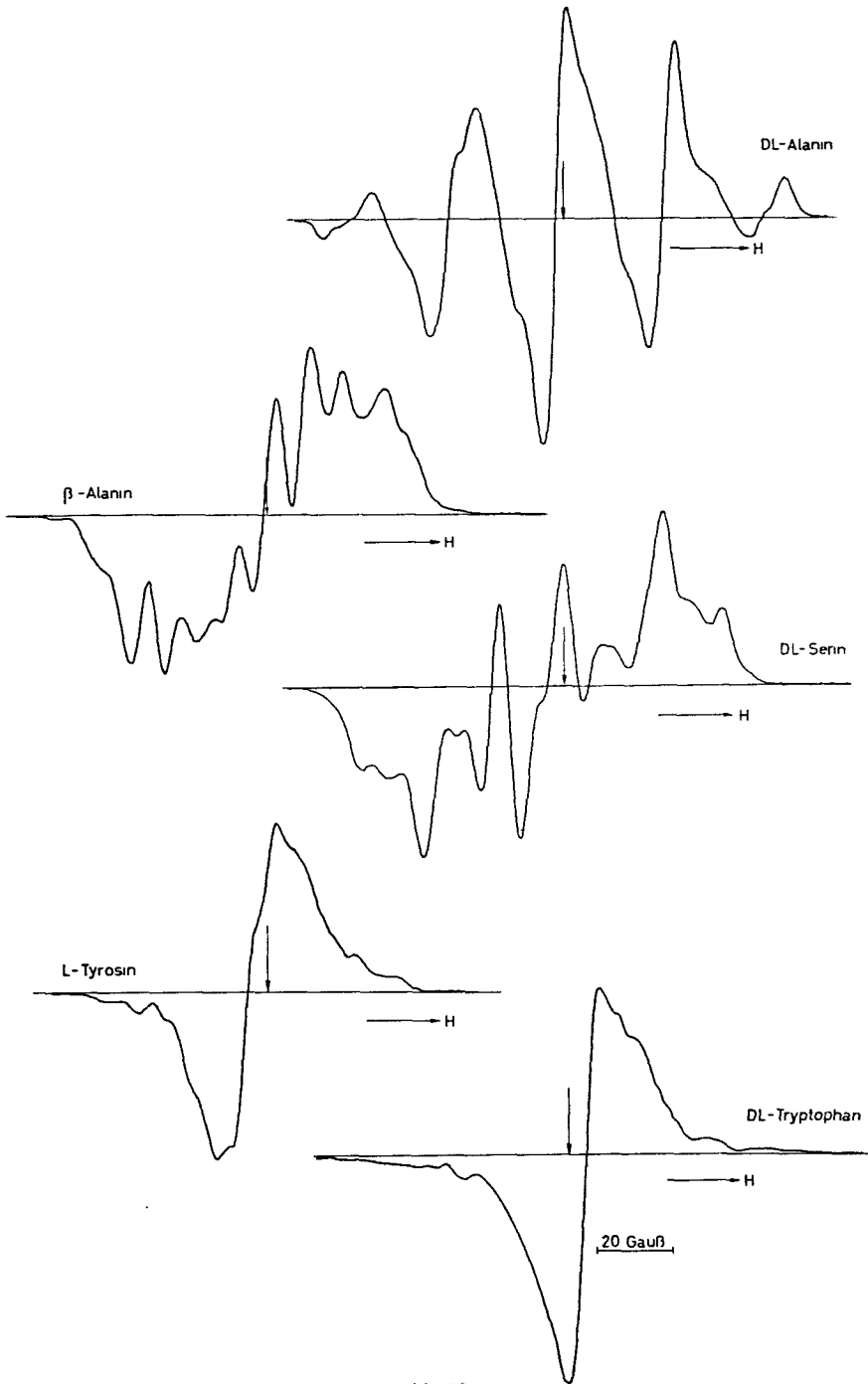


Abb. 8 b

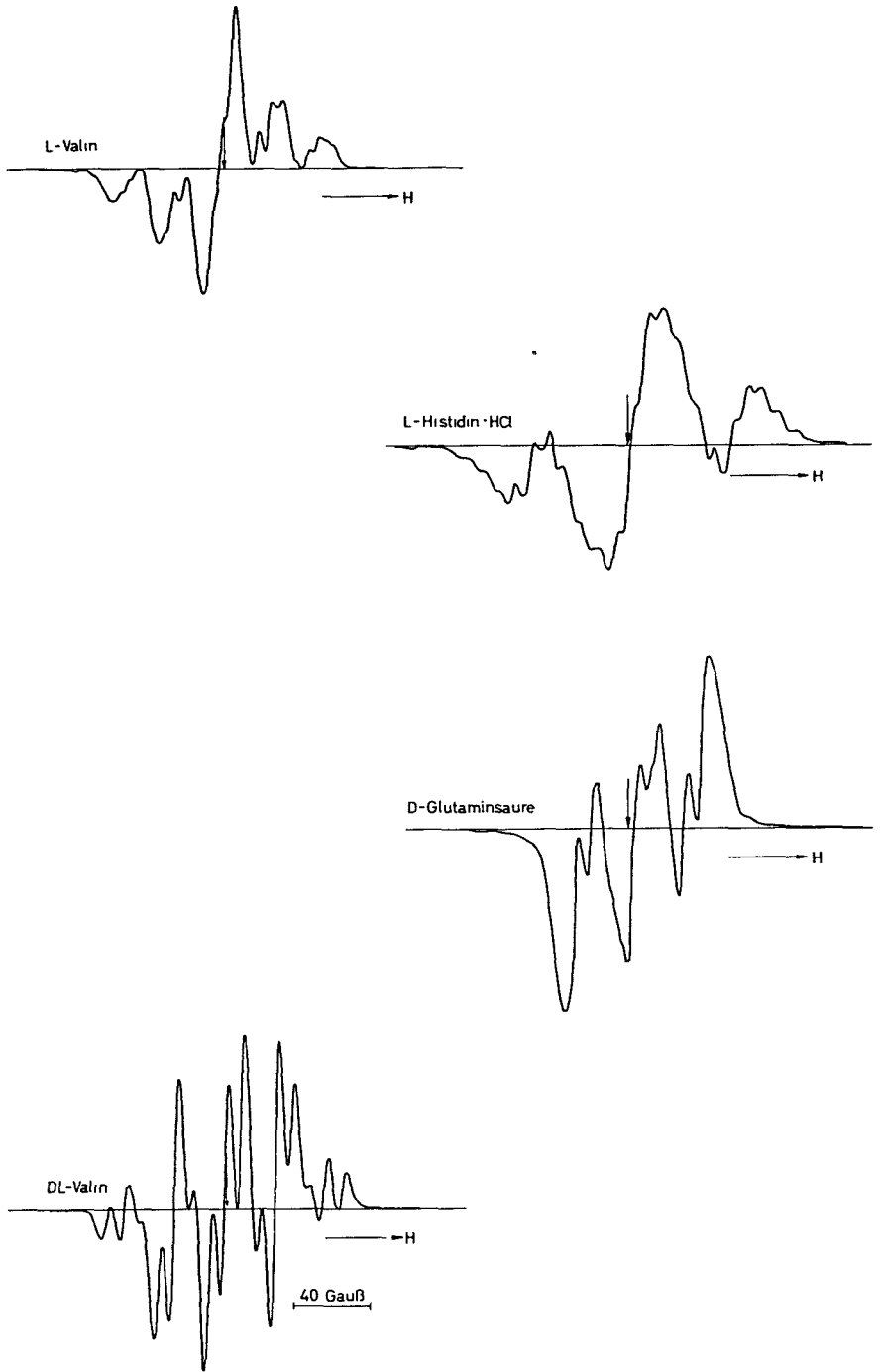


Abb. 8 c

Abb. 9. Dosis-effekt-kurven für bestrahlte Biochemikalien.

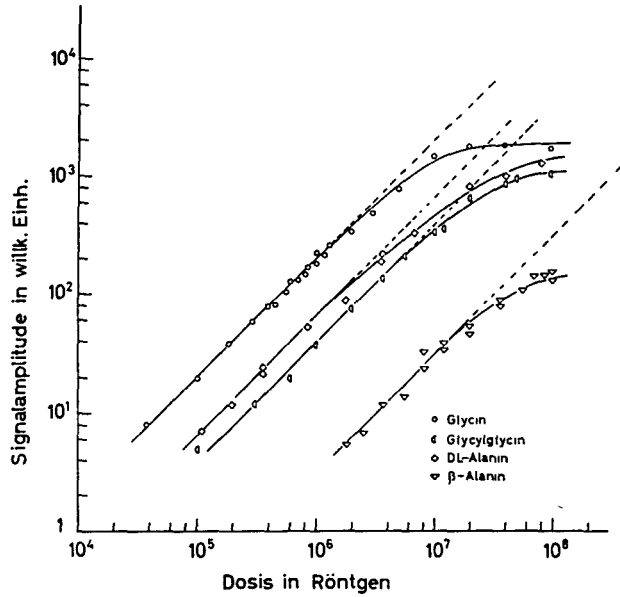
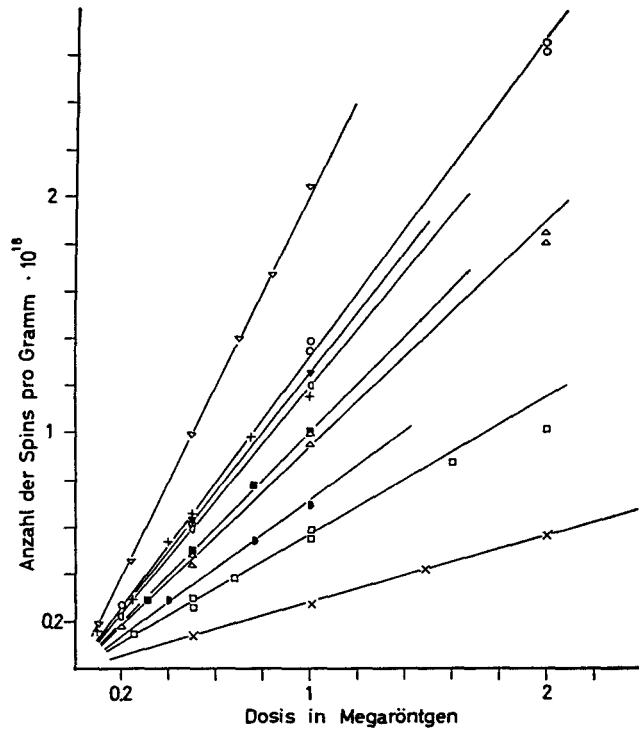


Abb. 10. Dosis-effekt-kurven für verschiedene bestrahlte Biochemikalien: Glycylglycine (∇), Glycine (+), DL-Serin (\circ), DL-Alanine (\blacktriangledown), L-Valin (\square), DL-Valin (\blacksquare), L-Prolin (\triangle), β -Alanin (\bullet), Kreatin (\square), Phenylalanin (X).



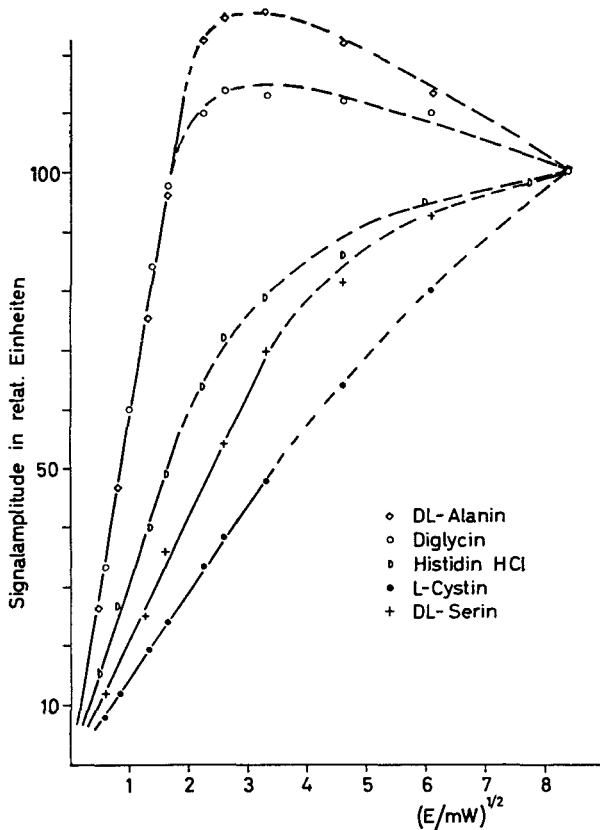


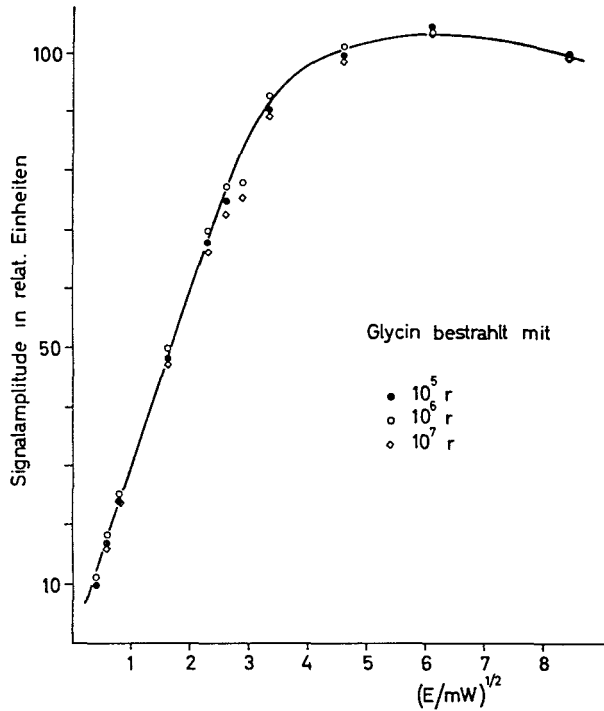
Abb. 11. Mikrowellensättigung für verschiedene Aminosäuren.

Laboratory, Teddington, geeicht war; c) mit einer Ionisationskammer der Physikalisch-Technischen Werkstätten, Freiburg/Brsg., die bei der Physikalisch-Technischen Bundesanstalt in Braunschweig geeicht war. Die mittlere Abweichung der Dosisanzeige betrug bei der Weichstrahlröhre (100 kV) 5%, bei der harten Strahlung der 150-kV-Röhre etwa 2%. Bei der Bestimmung des Energieaufwandes pro paramagnetischem Absorptionzentrum ergaben die Messungen an der gleichen Substanz bei Bestrahlung mit 100-kV-Röntgenstrahlung Übereinstimmung innerhalb der Meßgenauigkeit.

Insgesamt untersuchten wir 14 Aminosäuren und Peptide, die von den Firmen Merck, Darmstadt, und California Corporation for Biochemical Research, Los Angeles, bezogen waren. Bei den Messungen zeigten gleiche Substanzen von verschiedenen Herstellern identisches Verhalten. Die Substanzen wurden in trockenem polykristallinem Zustand in Plexiglasbehältern von etwa 20 mm ϕ mit Dosen zwischen 20 kR und 20 MR bei Zimmertemperatur an Luft bestrahlt. Das Flächengewicht der Proben bei Bestrahlung mit der 100-kV-Röhre war stets kleiner als 80 mg/cm². Die bestrahlten Aminosäuren wurden unmittelbar nach Bestrahlungsende in einem dünnwandigen Quarzrohr in den Doppelhohlraum des ESR-Spektrometers gebracht und die Spektren von Probe und Standard, wie oben beschrieben, registriert und ausgewertet.

2. *Ergebnisse.* Die Mikrowellenspektren der von uns untersuchten Substanzen sind in Abbildung 8 wiedergegeben. Bis zu Bestrahlungsdosen von etwa 5 MR wurde bei allen untersuchten Biochemikalien eine lineare Beziehung zwi-

Abb. 12. Mikrowellensättigung für Glycin, das mit verschiedenen Dosen bestrahlt wurde. Signalamplituden sind normiert auf maximal verfügbare Mikrowellenleistung.



schen Dosis und Anzahl der erzeugten Zentren paramagnetischer Absorption (Spinkonzentration) erhalten. Bei höheren Dosen tritt eine Abweichung von der Linearität auf, bis schließlich bei 20 MR eine weitere Bestrahlung keine Erhöhung der Spinkonzentration zur Folge hat. In den Abbildungen 9 und 10 sind für einige Substanzen die Dosiseffekturven aufgetragen.

Weiter wurde die Beziehung zwischen dem ersten Moment (M_1) und der Mikrowellenfeldstärke (H_1) am Ort der Probe bzw. \sqrt{E} untersucht und für verschiedene Aminosäuren sehr unterschiedliches Sättigungsverhalten festgestellt. Wie man aus Abbildung 1 entnehmen kann, ist die lineare Beziehung zwischen H_1 und M_1 nur bei Abschwächung der einfallenden Mikrowellenleistung um 15 dB bis 20 dB erfüllt, also bei Mikrowellenleistung unter 10 mW. Bei größeren Werten von H_1 tritt Sättigung auf, und M_1 ist nicht mehr proportional zur Spinkonzentration. Die Abweichung von der Geraden ist für verschiedene Aminosäuren unterschiedlich und beginnt bei verschiedenen Werten von H_1 . Dagegen ist die beobachtete Sättigungserscheinung für eine bestimmte Aminosäure unabhängig von der Bestrahlungsdosis. Für Glycin, das mit einer Dosis von 0,1 MR, 1 MR und 10 MR bestrahlt wurde, ist die Mikrowellensättigung in Abbildung 12 dargestellt. Die Messungen wurden auf die maximal zur Verfügung stehende Mikrowellenleistung normiert aufgetragen. Das Ergebnis in Abbildung 12 zeigt, daß das unterschiedliche Sättigungsverhalten unabhängig von der Spinkonzentration ist und somit auf verschieden starke Wechselwirkung der Zentren mit dem Gitter zurückgeführt werden kann.

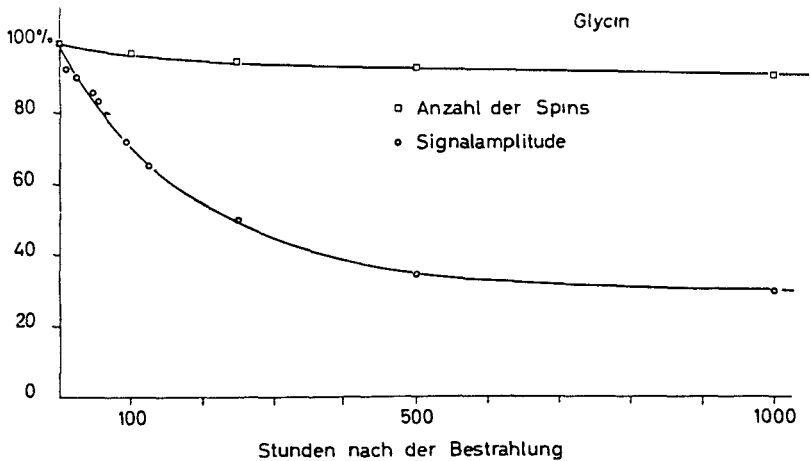
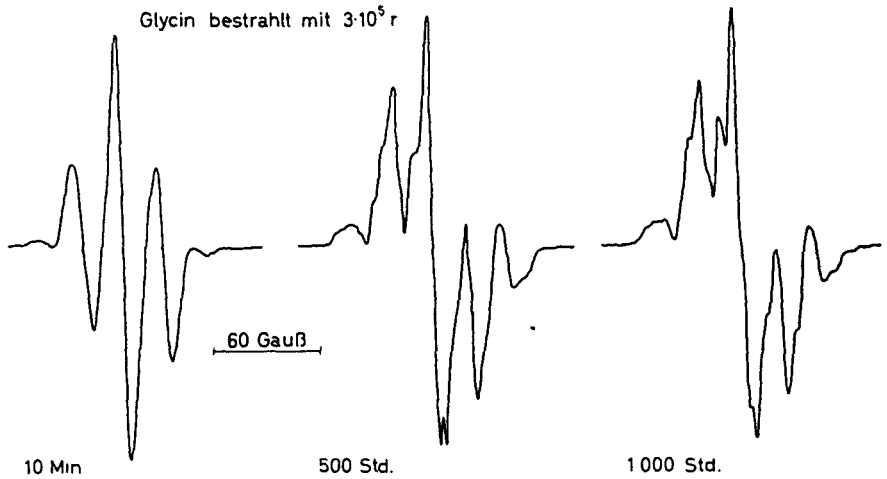


Abb. 13. Zeitliche Änderung der Spinkonzentration und der Form des Resonanzspektrums für bestrahltes Glycin. (Signalamplituden bei verschiedener Verstärkung registriert.)

Bei den untersuchten Substanzen wurde nach Bestrahlungsende eine Abnahme der Spinkonzentration mit der Zeit festgestellt. Für verschiedene Aminosäuren erhält man eine charakteristische Abnahme der Anzahl der Spinkonzentration, die unabhängig von der Bestrahlungsdosis ist. Für die Aminosäure Glycin und für das Peptid Glycylglycin wurde das Verhalten der ESR-Absorption nach der Bestrahlung näher untersucht. Dabei zeigt sich für Glycin, daß die Amplitude der ersten Ableitung schnell abnimmt, das Resonanzspektrum aber breiter wird, so daß sich das 1. Moment nur langsam ändert. Daraus erkennt man, daß sich das primär gebildete paramagnetische Absorptionszentrum in ein

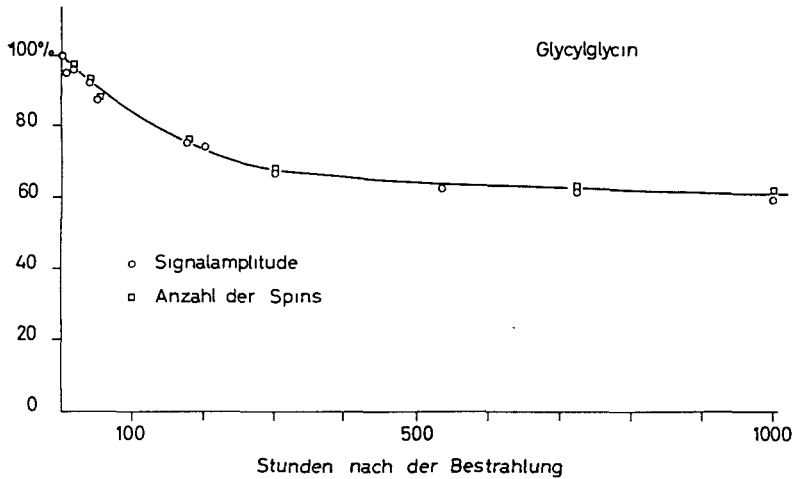


Abb. 14. Zeitliche Änderung der Signalamplitude und Spinkonzentration für bestrahltes Glycylglycin.

anderes umwandelt. Der Anteil der umgewandelten Zentren kann aus Abbildung 13 entnommen werden. Für Glycylglycin nehmen die Signalamplitude und das 1. Moment in gleichem Maße mit der Zeit ab. Es tritt hier also keine Umwandlung der Zentren auf, da sich auch die Form des Spektrums nicht ändert (Abb. 14). Auch bei den anderen untersuchten Biochemikalien fällt die Spinkonzentration in den ersten Minuten nach Bestrahlungsende nur sehr wenig ab. Es war daher nicht nötig, bei den Energieaufwandsbestimmungen zusätzliche Korrekturen anzubringen.

Zur Bestimmung des Energieaufwands pro erzeugtem Zentrum wurde nur mit Dosen bestrahlt, für die eine lineare Dosis-effektbeziehung gilt. Auch wurden die Spektren bei Mikrowellen-Energien aufgenommen, bei denen noch keine Mikrowellensättigung auftritt. An Glycin und Glycylglycin wurden auch Bestrahlungen und Messungen im Vakuum (10^{-5} Torr) durchgeführt und gleiche Ergebnisse wie an Luft erhalten. In Tabelle 4 sind die Werte für den Energieaufwand mit den Ergebnissen anderer Autoren zusammengestellt. Wie man sieht, unterscheiden sich die von uns gefundenen Werte für einfache Aminosäuren untereinander nur um einen Faktor von 2 bis 3, sie liegen alle im Bereich zwischen 25 und 81 eV. Eine Ausnahme machen Phenylalanin, Tryptophan und Tyrosin, also Aminosäuren, die einen aromatischen Ring enthalten. Für diese Verbindungen werden größere Energien benötigt, um Radikale zu erzeugen. Dieser Befund stimmt gut mit den Ergebnissen strahlenchemischer Untersuchungen überein, aus denen man weiß, daß Moleküle mit aromatischen Ringen (Benzol, Anthrazen, Terphenyl) große Energiebeträge dissipieren können.

Übersicht

1. Im Hinblick auf ihre Bedeutung für die quantitative Strahlenbiologie wurden die Grundlagen und Verfahren der quantitativen Absorptions-Spektrometrie mit Mikrowellen zur Bestimmung der Konzentration von Zentren paramagnetischer Absorption geprüft und weiterentwickelt.

2. Zur Aufnahme von Elektronen-Spin-Resonanzspektren eines Standards und einer zu untersuchenden Probe unter identischen Bedingungen, aber ohne die bisher übliche störende Überlagerung der Spektren wurden Doppel-Hohlräume für verschiedene Modulationsfrequenzen entwickelt und erprobt.

3. Für die Auswertung der Meßdaten, die bei den üblichen ESR-Apparaturen als 1. Ableitung des Absorptionsspektrums erhalten werden, untersuchten wir verschiedene Methoden, besonders auch bezüglich der Fehlerquellen. Die einfache Wägung mittels einer Momentenwaage erwies sich als schnell und genau.

4. Unter Anwendung der genannten Verfahren wurde eine Absoluteichung eines zeitlich konstanten Standards der Spinkonzentration unter Verwendung mehrerer, voneinander unabhängiger Verfahren durchgeführt. Alle Verfahren ergaben gut übereinstimmende Werte.

5. Die Verwendung absolut geeichter Standardpräparate und der schnellen und genauen Meß- und Auswertungsmethoden ermöglichte umfangreiche Untersuchungen zur Ausbeute der Erzeugung von Zentren paramagnetischer Absorption in Aminosäuren und Polypeptiden durch Röntgenstrahlen. Dabei wurden mögliche Fehlerquellen, wie Mikrowellensättigung (durch die bei verschiedenen Aminosäuren verschieden starke Spin-Gitter-Wechselwirkung), zeitlicher Abfall nach der Bestrahlung und Sättigung durch zu hohe Strahlendosen, geprüft und ausgeschlossen.

6. Im Gegensatz zu den auch für eine bestimmte Aminosäure oft um mehr als eine Größenordnung schwankenden Literaturangaben zeigte sich bei Abschließen der genannten Fehlerquellen, daß der Energieaufwand pro paramagnetisches Zentrum für alle untersuchten Stoffe (auch von verschiedenen Herstellern bezogen) sehr gut reproduzierbar ist. Er liegt für die einfachen Aminosäuren zwischen 25 und 81 eV, für die einen aromatischen Ring enthaltenden wesentlich höher. Dieser Befund steht in guter Übereinstimmung mit der aus der Strahlenchemie bekannten Tatsache, daß aromatische Ringe erhebliche Energiezufuhren ohne Beschädigung des Moleküls, dem sie angehören, aufnehmen und dissipieren. Über analoge quantitative Messungen an Nucleinsäuren und Proteinen, aber auch an intakten elementaren biologischen Strukturen in Form ganzer Bakteriophagen wird in anschließenden Arbeiten berichtet.

Zusammenfassung

Der Nachweis, daß strahleninduzierte freie Radikale ein wichtiges Glied der zu beobachtbaren biologischen Effekten führenden Ereigniskette bilden, erfordert quantitative Untersuchungen. In der vorliegenden Mitteilung beschreiben wir erstens Methoden zur Aufnahme und quantitativen Auswertung von ESR-Absorptionsspektren, zweitens zur Eichung von Substandards der Konzentration freier Spins und drittens Messungen der Ausbeute bei der Erzeugung von ESR-Absorptionszentren durch Röntgenbestrahlung von Aminosäuren.

Summary

In order to definitely ascertain that radiation induced free radicals form an important link in the chain of events leading to observable biological effects experiments of quantitative nature are required. The present communication describes 1. methods for obtaining and evaluating e.s.r.-absorption spectra quantitatively, 2. for calibrating substandards in terms of concentration of free spins and 3. measurements of the yield of production of centers of e.s.r. absorption by X-raying amino acids.

Résumé

Des recherches quantitatives sont nécessaires pour prouver que les radicaux libres, induits par les radiations, représentent un chaînon important dans la suite de résultats déterminant des effets biologiques appréciables. Les auteurs décrivent: 1. des méthodes d'enregistrement et de l'évaluation quantitative des spectres d'absorption R.E.S., 2. des méthodes pour l'étalonnage des substandards de la concentration des spins libres, 3. des mesures de l'utilisation lors de la production de centres d'absorption R.E.S. par irradiation d'acides aminés.

Schrifttum

Alexander, P., J. T. Lett u. M. G. Ormerod: *Biochim. biophys. Acta* 51 (1961): 207. — Androes, G. M., u. M. Calvin: *Biophys. J.* 2 (1962) Suppl. 217. — Atwood, K. C.: *Ann. Rev. nuclear Sci.* 9 (1959): 553. — Blumenfeld, L. A., u. A. E. Kalmanson: *Biofizika* 2 (1957): 552; 3 (1958): 87; in: *The initial effects of ionizing radiations on cells.* Ed. R. J. C. Harris, S. 59. London 1961. — Boag, J. W., u. A. Müller: *Nature* 183 (1959a u. b): 831. — Box, H. C., u. H. G. Freund: *Nucleonics* 17 (1959) Nr. 1: 66. — Box, H. C., H. G. Freund u. K. Lilga: in: *Free radicals in biological systems.* Ed. M. S. Blois et al., S. 239. New York 1961. — Burgess, V. R.: *J. sci. Instrum.* 38 (1961): 98. — Collins, R. L.: *Rev. sci. Instrum.* 30 (1959): 492. — Combrisson, J., u. J. Uebersfeld: *C.R. Acad. Sci.* 238 (1954): 1397. — Conger, A. D.: *J. cell. comp. Physiol.* 58 (1961) Suppl. 1: 27; *Proc. Harrogate Congr. Radiat. Res. Amsterdam 1963.* — Conger, A. D., u. M. L. Randolph: *Radiat. Res.* 11 (1959): 54. — Dorlet, C., A. van de Vorst u. A. J. Bertinchamps: *Nature* 194 (1962): 767. — Duchesne, J., u. J. Depireux: in: *International Atomic Energy Agency Symposium on biological effects of ionizing radiation at the molecular level.* S. 149. Wien 1962. — Ehrenberg, A.: in: *Free radicals in biological systems.* Ed. M. S. Blois et al., S. 337. New York 1961. — Ehrenberg, A., u. L. Ehrenberg: *Ark. Fysik* 14 (1958): 133. — Ehrenberg, A., L. Ehrenberg u. G. Löfroth: *Risö Report Nr. 16* (1960): 21. — Ehrenberg, A., L. Ehrenberg u. K. G. Zimmer: *Acta chem. scand.* 11 (1957): 199. — Ehrenberg, L., u. K. G. Zimmer: *Hereditas* 42 (1956): 515. — Ehret, C. F., B. Smaller, E. L. Powers u. R. B. Webb: *Science* 132 (1960): 1768. — Fairbanks, L. Ch., u. L. P. Kajushin: *Transl. Sov. Phys. Doklady* 5 (1960): 1394. — Fairbank, A. J.: *Radiat. Res.* 7 (1957): 314. — Feher, G.: *Physic. Rev.* 106 (1957): 1122. — v. Förster, G.: *Z. Naturforsch.* 15a (1960): 1079. — Fränz, J., u. M. L. Randolph: *Proc. Harrogate Congr. Radiat. Res. Amsterdam 1963.* — Goldschmidt, S., u. K. Renn: *Ber. dtsh. Chem. Ges.* 55 (1922): 628. — Gordy, W.: in: *Symposium on information theory in biology.* Ed. H. P. Yockey, R. L. Platzman u. H. Quastler. London-New York 1958; *Radiat. Res. Suppl.* 1 (1959): 491. — Gordy, W., W. B. Ard u. H. Shields: *Proc. nat. Acad. Sci.* 41 (1955 a): 983; 41 (1955 b): 996. — Gordy, W., u. I. Miyagawa: *Radiat. Res.* 12 (1960): 211. — Gordy, W., u. H. N. Rexroad: in: *Free radicals in biological systems.* Ed. M. S. Blois et al., S. 263. New York 1961. — Gordy, W., u. H. Shields: *Radiat. Res.* 9 (1958): 611; *Proc. nat. Acad. Sci.* 46 (1960): 1124; *Verhandelingen: Koninklijke Academie van België. Klasse der Wetenschappen II* 33 (1961) Nr. 3: 191. — Henglein, A., M. Boysen u. W. Schnabel: *Z. phys. Chem. N.F.* 10 (1957): 137. — Henriksen, T.: in: *Free radicals in biological systems.* Ed. M. S. Blois et al., S. 279. New York 1961; *J. Chem. Phys.* 36 (1962 a): 1258; *J. Chem. Phys.* 1962 b (im Druck); *Nature* 193 (1962 c): 371; *Radiat. Res.* 17 (1962 d): 158; *Proc. Harrogate Congr. Radiat. Res. Amsterdam 1963.* — Henriksen, T., u. A. Pihl: *Nature* 185 (1960): 307; *Int. J. Radiat. Biol.* 3 (1961): 351. — Henriksen, T., T. Sanner u. A. Pihl: *Proc. Harrogate Congr. Radiat. Res. Amsterdam 1963.* — Hyde, J. S.: *Physic. Rev.* 119 (1960): 1483. — Ingram, D. J. E.: *Spectroscopy of Radio and Microwave Frequencies.* London 1955; *Free Radicals as Studied by Electron Spin Resonance.*

- London 1958. — *Kalmanson, A. E.*, u. *L. A. Blumenfeld*: *Biofizika* 3 (1958): 735. — *Katayama, M.*, u. *W. Gordy*: *J. Chem. Phys.* 35 (1961): 117. — *Kirby-Smith, J. S.*, u. *M. L. Randolph*: in: Immediate and low level effects of ionizing radiations. Ed. *A. A. Buzzati-Traverso*, S. 11. London 1960; *J. cell. comp. Physiol.* 58 (1961) Suppl. 1: 1. — *Klingmüller, W.*: in: Internat. Atomic Energy Agency Symposium on Effects of ionizing radiations on seeds, S. 67. Wien 1961 a; in: *Progress in Photobiology*. Ed. *B. Chr. Christensen* et al., S. 261. Amsterdam 1961 b; *Int. J. Radiat. Biol.* 4 (1961 c): 255. — *Klingmüller, W.*, u. *M. C. Saxena*: *Naturwissenschaften* 46 (1959): 475. — *Koch, R.*, u. *J. Fränzl*: *Proc. Harrogate Congr. Radiat. Res.* Amsterdam 1963. — *Koch, R.*, *J. Fränzl* u. *K. Markau*: *Atompraxis* 8 (1962): 345. — *Koch, R.*, u. *K. Markau*: *Z. Naturforsch.* 16 b (1961): 586. — *Köhnlein, W.*: Diss. Heidelberg 1962. — *Köhnlein, W.*, u. *A. Müller*: *Z. Naturforsch.* 15 b (1960): 138; in: *Free radicals in biological systems*. Ed. *M. S. Blois* et al., S. 113. New York 1961; *Phys. Med. Biol.* 6 (1962): 599. — *Kurita, Y.*: *J. Chem. Phys.* 36 (1962): 560. — *Kurita, Y.*, u. *W. Gordy*: *J. Chem. Phys.* 34 (1961 a): 282; 34 (1961 b): 1285. — *Laurila, E.*: *Soc. Sci. Fenn., Comm. Phys. Math.* 10 (1939): 1. — *Libby, D.*, *M. G. Ormerod*, *A. Charlesby* u. *P. Alexander*: *Int. J. Radiat. Biol.* 4 (1961 a): 21; *Nature* 190 (1961 b): 998. — *McCormick, G.*, u. *W. Gordy*: *J. Phys. Chem.* 62 (1958): 783. — *Miyagawa, I.*, u. *W. Gordy*: *J. Chem. Phys.* 32 (1960): 255. — *Molin, J. N.*, *A. T. Korickij* u. *A. G. Semenov*: *Pribory i tekhnika eksper.* 6 (1960): 73. — *Müller, A.*: *Int. J. Radiat. Biol.* 5 (1962a): 199; in: *International Atomic Energy Agency Symposium on biological effects of ionizing radiation at the molecular level*. S. 61. Wien 1962 b; *Int. J. Radiat. Biol.* (im Druck 1963 a); *Proc. Harrogate Congr. Radiat. Res.* Amsterdam 1963 b. — *Müller, A.*, u. *K. G. Zimmer*: *Strahlentherapie* 109 (1959): 192; in: *Free radicals in biological systems*. Ed. *M. S. Blois* et al., S. 325. New York 1961. — *Müller, E.*, u. *H. Metzger*: *Chem. Ber.* 88 (1955): 165. — *Nielsen, S. O.*, u. *B. V. Rasmussen*: in: *International Atomic Energy Agency Symposium on biological effects of ionizing radiation at the molecular level*. S. 137. Wien 1962. — *Norman, A.*, u. *W. Ginoza*: *Radiat. Res.* 9 (1958): 77. — *Patten, F.*, u. *W. Gordy*: *Proc. nat. Acad. Sci.* 46 (1960): 1137. — *Pohlitz, H.*, *B. Rajewsky* u. *A. Redhardt*: in: *Free radicals in biological systems*. Ed. *M. S. Blois* et al., S. 367. New York 1961. — *Portis, A. M.*: *Physic. Rev.* 91 (1953): 1072. — *Powers, E. L.*: in: *The initial effects of ionizing radiations on cells*. Ed. *R. J. C. Harris*, S. 91. London-New York 1961 a; *J. cell. comp. Physiol.* 58 (1961 b) Suppl. 1: 13. — *Powers, E. L.*, *C. F. Ehret* u. *B. Smaller*: in: *Free radicals in biological systems*. Ed. *M. S. Blois* et al., 351. New York 1961. — *Powers, E. L.*, *R. B. Webb* u. *C. F. Ehret*: *Radiat. Res. Suppl.* 2 (1960): 94. — *Prydz, S.*, u. *T. Henriksen*: *Acta chem. scand.* 15 (1961): 791. — *Pulatova, M. K.*: *Biofizika* 7 (1962): 402. — *Pulatova, M. K.*, *V. N. Rogulenkova* u. *L. P. Kajushin*: *Biofizika* 6 (1961): 548. — *Rajewsky, B.*, u. *A. Redhardt*: *Nature* 193 (1962): 365; *Proc. Harrogate Congr. Radiat. Res.* Amsterdam 1963. — *Randolph, M. L.*: *Rev. sci. Instrum.* 31 (1960): 949; in: *Free radicals in biological systems*. Ed. *M. S. Blois* et al., S. 249. New York 1961. — *Randolph, M. L.*, u. *A. H. Haber*: in: *International Atomic Energy Agency Symposium on Effects of ionizing radiation on seeds*, S. 57. Wien 1961. — *Randolph, M. L.*, u. *D. L. Parrish*: *Radiat. Res.* 9 (1958): 170. — *Rexroad, H. N.*, u. *W. Gordy*: *Proc. nat. Acad. Sci.* 45 (1959): 256. — *Rotblat, J.*, u. *J. A. Simmons*: *Proc. Harrogate Congr. Radiat. Res.* Amsterdam 1963. — *Schirmer, O.*, u. *K. Sommermeyer*: *Atompraxis* 8 (1962) Nr. 8: 1. — *Schwenker, R. P.*: *Rev. sci. Instrum.* 30 (1959): 1012. — *Shen, P. G.*, *L. A. Blumenfeld*, *A. E. Kalmanson* u. *A. G. Pasynskii*: *Biofizika* 4 (1959): 263. — *Shields, H.*, u. *W. Gordy*: *J. Phys. Chem.* 62 (1958): 789; *Proc. nat. Acad. Sci.* 45 (1959): 269. — *Simmons, J. A.*: *J. Chem. Phys.* 36 (1962): 469. — *Singer, L. S.*: *J. appl. Phys.* 30 (1959): 1463. — *Singh, B. B.*, *B. Venkateraman*, *N. K. Notani* u. *K. G. Bora*: *Proc. Harro-*

gate Congr. Radiat. Res. Amsterdam 1963. — *Smaller, B.*, u. *E. C. Avery*: Nature 183 (1959): 539. — *Sommermeier, K.*, u. *O. Schirmer*: Proc. Harrogate Congr. Radiat. Res. Amsterdam 1963. — *Sparman, B.*, *L. Ehrenberg* u. *A. Ehrenberg*: Acta chem. scand. 13 (1959): 199. — *Stöckmann, F.*: in: *Landolt-Börnstein, Zahlenwerte und Funktionen* 1, T. 4 (1955): 981. — *Usatyi, A. F.*, u. *Ju. S. Lasurkin*: in: International Atomic Energy Agency Symposium on biological effects of ionizing radiation at the molecular level. S. 37. Wien 1962. — *van de Vorst, A.*, *J. M. van der Kaa*, *J. Depireux*, *J. Duchesne* u. *A. J. Bertinchamps*: C. R. coll. ampère, 9^e coll., S. 297. Pisa 1960. — *Yariv, A.*, u. *J. P. Gordon*: Rev. sci. Instrum. 30 (1961): 462. — *Zimmer, K. G.*: Radiat. Res. Suppl. 1 (1959): 519; Studies on Quantitative Radiation Biology. Edinburgh-London 1961; Problemy kolitshestvennoj radiobiologii. Moskau 1962 a; Sdbd. zur Strahlentherapie 51 (1962 b): 46. — *Zimmer, K. G.*, *L. Ehrenberg* u. *A. Ehrenberg*: Strahlentherapie 103 (1957): 3.