

Specimens are complexed with OPT in a 100 °C waterbath for 10 min. Tubes are cooled to room temperature in running tap water and read. Specimens extracted with chloroform are handled as follows: 3.2 ml of chloroform are added to each tube after OPT complexing and cooling to room temperature. Tubes are then shaken for 5 min using a platform shaker<sup>10</sup> and then centrifuged for 5 min at 2300 rpm<sup>11</sup> to aid partition. 1.5 ml of the upper, aqueous phase is taken for reading.

**Results.** Serotonin-OPT Standards. In the absence of a chloroform wash the blank produced atypicality (Figure 1, a), and high and variable primary scattering. Specimens washed with chloroform, however, showed reduced primary scattering and blank peaks (Figure 1, b) with the production of characteristic serotonin-OPT spectra peaking maximally at 473 nm wavelength.

**Tissues.** Gross interference by blank components (Figure 2, a) producing atypical spectra is seen in the duplicates of SF, and in the PA; a small blank contribution is seen in the MJ sample producing minimal atypicality. The AC peaks at 473 nm wavelength and although it contains a blank this component, relative to the serotonin-OPT fluorescence, is minimal and does not produce atypicality. Specimens washed with chloroform (Figure 2, b) show reduced primary scattering and characteristic serotonin-OPT peaks; the duplicate stomach fundi are superimposable.

**Serotonin-OPT Solubility.** The partition isotherm<sup>12</sup> for serotonin-OPT at room temperature (20 °C) was linear for serotonin concentrations 40–200 ng/ml (Figure 3). The partition coefficient ( $K$ ) was  $4.9 \pm 0.3$  ( $n = 5$ ). The chloroform wash removed 17% of the serotonin-OPT complex.

**Discussion.** Reagent blanks are frequently a problem in fluorometry especially when biological specimens are

available in small quantities and their assay conducted in ppb. Use of high quality reagents and water has not solved this problem<sup>2, 3, 13, 14</sup>. Filters cannot be used to selectively remove blank fluorescence at the wavelength of maximal serotonin or serotonin-OPT fluorescence. Therefore, they do not improve the accuracy of reading but in fact reduce detection sensitivity<sup>3</sup>. A single wash with an equal volume of chloroform was found to lower blank fluorescence with only a 17% loss of serotonin-OPT, and to yield typical serotonin-OPT spectra peaking at 473 nm wavelength. Reduced serotonin-OPT loss can be achieved by using a smaller chloroform: aqueous ratio. The chloroform wash was found to reduce and standardize primary scattering by removal of precipitated OPT, and to have no effect on acidity and temperature relationships for maximal fluorescence<sup>4</sup> or the excitation and emission spectra of serotonin-OPT (THOMPSON and SPEZIA, unpublished). Use of chloroform enables a greater detection sensitivity for serotonin-OPT<sup>3</sup>; it has been in use in our laboratory for over 2 years<sup>15</sup>.

**Résumé.** Dans la détermination fluorimétrique du complexe sérotonine-OPT, le lavage des spécimens avec un volume égal de chloroforme, avant de l'évaluation, réduit l'interférence des blancs et la dispersion primaire. Cela permet une évaluation plus exacte de la fluorescence de la sérotonine et, dans quelques cas, l'usage de spectres autrement illisibles.

J. H. THOMPSON, CH. A. SPEZIA  
and M. ANGULO

Department of Pharmacology and  
Experimental Therapeutics U.C.L.A. School of Medicine,  
Los Angeles (California 90024, USA),  
15 September 1969.

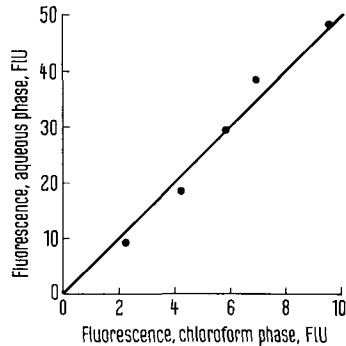


Fig. 3. Partition isotherm for serotonin-OPT in chloroform at 20 °C. Fluorescence intensity of aqueous phase obtained from spectra of 40, 80, 120, 160 and 200 ng/ml serotonin-OPT standards. Instrumental conditions were activation wavelength 355 nm, attenuation 0.3% full scale, sensitivity 0 sensitivity units and cell temperature 20 °C. Fluorescence intensity of chloroform phase determined by difference.

<sup>5</sup> American Instrument Co., Inc., Aminco-Bowman, 8030 Georgia Avenue, Silver Spring (Maryland 20910, USA).

<sup>6</sup> Honeywell 320 Solid State XY Recorder, 4800 East Dry Creek Rd., Denver (Colorado 80217, USA).

<sup>7</sup> J. H. THOMPSON, C. A. SPEZIA and M. ANGULO, Experientia 25, 1007 (1969).

<sup>8</sup> J. H. THOMPSON, C. A. SPEZIA and M. ANGULO, Analyt. Biochem., 31, 321 (1969).

<sup>9</sup> J. H. THOMPSON, Ir. J. med. Sci. 490, 411 (1966).

<sup>10</sup> Precision Scientific Co., 3737 W. Cortland St., Chicago, Ill. (USA Model 65885).

<sup>11</sup> International Equipment Co., 300 2nd Avenue, Needham Heights, Massachusetts 02194.

<sup>12</sup> L. C. CRAIG and D. CRAIG, in *Technique of Organic Chemistry* (Ed. A. WEISSBERGER; Interscience Publishers, Inc., New York 1950), p. 182.

<sup>13</sup> W. B. QUAY, Analyt. Biochem. 5, 51 (1963).

<sup>14</sup> R. M. FLEMING, W. G. CLARK, E. D. FENSTER and J. C. TOWNE, Analyt. Chem. 37, 692 (1965).

<sup>15</sup> Supported in part by the American Medical Association Education and Research Foundation.

## Die näherungsweise graphische Darstellung von Isopotentiallinien aus EEG-Mehrkanalregistrierungen mittels EDV-Anlage

Bei Untersuchungen, in denen eine Variable (zum Beispiel bioelektrische Spannungen) eines zweidimensionalen Prozesses (oder eines dreidimensionalen, der nur an der Oberfläche abgeleitet wird) mittels mehrerer Elektroden registriert wird, erscheint es wünschenswert, eine zumin-

dest annähernde Darstellung dieses zweidimensionalen Prozesses zu erhalten, da die Mehrkanalregistrierung recht unanschaulich und ihr zum Beispiel eine Verlagerung von Spannungshügeln kaum zu entnehmen ist. Eine Verbesserung ergibt sich durch die Topogrammdarstel-

lung<sup>1,2</sup>, doch wird auch hier nur ein Teil der in den Registrierungen enthaltenen räumlichen Information erkennbar.

*Methode.* Eine zumindest näherungsweise Darstellung wird hingegen durch die zweifache Interpolation zwischen den Messpunkten mittels LAGRANGEScher Interpolationspolynome möglich. Hierbei wird zunächst zwischen allen vertikalen Messpunkten interpoliert und dann mit Hilfe der so gewonnenen «Stützpunkte» zeilenweise horizontal interpoliert. Seien  $X_0, X_1, \dots, X_n$  jene Stellen, an denen das Polynom die Werte  $Y_0, Y_1, \dots, Y_n$  annehmen soll, dann ergibt sich das Polynom  $Q(x)$  als

$$Q(X) = \sum_{i=0}^n Y_i \frac{P_i(X)}{P_i'(X_i)},$$

wobei

$$\begin{aligned} P_i(X) &= (X - X_0)(X - X_1) \dots (X - X_{i-1}) \\ &\quad \times (X - X_{i+1}) \dots (X - X_n) \end{aligned}$$

bedeutet. Im Gegensatz etwa zur Methode der kleinsten Quadrate geht die Kurve genau durch die vorgegebenen Punkte; dafür ist die anzunähernde Funktion aber nicht frei wählbar, sondern ein Polynom, wobei der Grad dieses Polynoms um eins weniger als die Anzahl der Messpunkte

```

C PROGRAMM DARSTELLUNG VON ISOPOTENTIALLINIEN
C
      DIMENSION XC(58),IN(58),YC(58,4),Y(4),D(4,4),XK(58),AA(58),AR(20)
      READ (1,600)(XK(I),I=1,20)
      FORMAT (1X,20A2)
      READ (1,601) F
      FORMAT (F4.1)
      READ (1,101)(D(I,J),I=1,4),J=1,4),NV,NK
      FORMAT (16F4.1,12X,21>)
      WRITE (3,9) NV,NK
      FORMAT (///////////// VERSUCHSNR. ,I2,7X,I KARTENNR. ,I2/I)
      WRITE (3,7)(D(I,J),I=1,4),J=1,4)
      FORMAT (' MESSWERTE ',16F6.1//)
C
C VERTIKAL FUNKTIONSWERTE
C
      DO 20 J=1,4
      DO 20 I=1,4
      D(I,J)=D(I,J)/F
      DO 12 J=1,4
      DO 11 I=1,4
      Y(I)=D(I,J)
      DO 12 K=1,58
      XK
      CALL LAGINT(Q,X,Y)
      YC(K,J)=Q
C
C HORIZONTAL FUNKTIONSWERTE
C
      DO 100 K=1,58
      DO 15 J=1,4
      Y(J)=YC(K,J)
      DO 16 I=1,58
      X=I
      CALL LAGINT(Q,X,Y)
      XC(I)=Q
C
C ZFILENAUSDRUCK
C
      DO 500 I=2,57
      AA(I)=AR(20)
      DO 1 J=1,58
      IN(J)=XC(J)
      KK=IN(I)+10
      AA(I)=AR(KK)
      KK=IN(58)+10
      AA(58)=AR(KK)
      DO 201 I=1,58
      IN(I)=IN(I)+20
      DO 200 I=2,57
      I1=I-1
      IF (IABS(IN(I))-IABS(IN(I1)))>204,200,203
      KK=IN(I1)-10
      AA(I)=AR(KF)
      GO TO 200
      203 KK=IN(I)-10
      AA(I)=AR(KL)
      200 CONTINUE
      WRITE (3,5)(AA(I),I=1,58)
      FORMAT(1X,58A2)
      100 CONTINUE
      GO TO 8
C 1.VORLAUFKARTE ERGÄT SICH DURCH ENTFERNEN VON C AUS FOLGENDER
C KARTE
      -9-8-7-6-5-4-3-2-1 **+1+2+3+4+5+6+7+8+9
      END
      SUBROUTINE LAGINT(Q,X,Y)
      DIMENSION Y(1)
      Q=(X-20.)*((X-39.)*(X-58.)*Y(1)/4154.+*(X-).)*(X-39.)*(X-58.)*Y(2)
      1/13718.-*(X-1.)*(X-20.)*(X-58.)*Y(3)/13718.+(X-1.)*(X-20.)*(X-39.)*
      2Y(4)/41154.
      RETURN
      END

```

Fig. 1. Hauptprogramm und Unterprogramm LAGINT.

beträgt. Die graphische Darstellung fordert die Einführung eines Abbildungsmaßstabes, die in einer geeigneten Festsetzung der Anzahl der zwischen je zwei Messpunkten zu interpolierenden Werte besteht. Die aufeinanderfolgende Interpolation liefert eine Matrix von Potentialwerten, wobei die graphische Verbindung von gleichgrossen Werten die Isopotentiallinien ergibt; aus Gründen der Zweckmässigkeit wird man aber nur ganzzahlige Werte miteinander verbinden. Da die numerische Durchführung dieses Verfahrens, das für Messwerte zu verschiedenen Zeitpunkten wiederholt angewandt werden muss, sehr aufwendig ist, wurde ein Programm in FORTRAN IV zur Durchführung der Berechnungen auf einer elektronischen Datenverarbeitungsanlage geschrieben. Dieses Programm wurde für eine konkrete Versuchsanordnung (16 Elektroden in einem quadratischen Netz  $4 \times 4$  angeordnet) verfasst, kann jedoch ohne Schwierigkeiten auch für den Fall von nicht quadratischen und/oder nicht äquidistanten Elektrodenanordnungen umgeschrieben werden.

Die Datenaufbereitung erfolgte zunächst durch Ziehen von äquidistanten Linien auf dem Registrierpapier (der Abstand entsprach einem Zeitintervall von 16 msec) und Abmessen der jeweils 16 Spannungen. Diese 16 Werte (1. Wert der 1. Spalte bis 4. Wert der 4. Spalte) wurden vierspaltig (incl. Vorzeichen) in eine Lochkarte gestanzt, auf der auch eine Kartenkennzeichnung (2 Stellen für Versuchsnummer, 2 Stellen für fortlaufende Kartennummer) Platz fand. Da für den Ausdruck kein Plotter zur Verfügung stand, wurde die Anzahl der interpolierten Werte zwischen zwei Messpunkten so gewählt, dass der gesamte Ausdruck annähernd quadratisch wurde, wenn die Isopotentiallinien als zweistellige Zeichen (Vorzeichen + eine Ziffer) ausgedruckt wurden und zwischen den Zeilen ein einzeiliger Zwischenraum gelassen wurde.

Die so gewählten Werte für  $X_0, X_1, X_2, X_3$  betragen 1, 20, 39 und 58, daraus resultierte

$$\begin{aligned} P_0(X) &= (X-20)(X-39)(X-58) \\ P_1(X) &= (X-1)(X-39)(X-58) \\ P_2(X) &= (X-1)(X-20)(X-58) \\ P_3(X) &= (X-1)(X-20)(X-39) \end{aligned}$$

sowie die Reziprokwerte der Koeffizienten

$$\begin{aligned} P_0(X_0) &= (-1-20)(-1-39)(-1-58) = -41154 \\ P_1(X_1) &= (20-1)(20-39)(20-58) = +13718 \\ P_2(X_2) &= -P_1(X_1) = -13718 \\ P_3(X_3) &= -P_0(X_0) = +41154 \end{aligned}$$

Das Interpolationspolynom  $Q(X)$ , das als Subroutine-Unterprogramm LAGINT programmiert wurde, ergab sich daher als

$$\begin{aligned} Q(X) &= -[(X-20)(X-39)(X-58).Y_1/41154] + [(X-1). \\ &\quad \times (X-39)(X-58).Y_2/13718] - [(X-1)(X-20). \\ &\quad \times (X-58).Y_3/13718] + [(X-1)(X-20)(X-39). \\ &\quad \times Y_4/41154]. \end{aligned}$$

Im Rechenablauf werden 2 Vorlaufkarten eingelesen: Eine erste Karte, die die Werte  $-9, -8, \dots, -1, *, +1, \dots, +9$  enthält und den Ausdruck im A-Format ermöglicht (siehe Programm in Figur 1), und eine zweite Karte, auf der ein Normierungswert F, durch den alle Messwerte dividiert werden muss,

<sup>1</sup> A. REYMOND, Rev. Neurol. 93, 399 (1955).

<sup>2</sup> H. PETSCHE, Wien. Z. Nervenheilk. 25, 373 (1967).

dass kein Potentialwert ausserhalb des abgeschlossenen Intervalls (-9, +9) liegen kann.

Nach dem Einlesen der Datenkarten werden zunächst die Funktionswerte der 4 Polynome errechnet, die eine Verbindung der jeweils 4 untereinanderstehenden Messpunkte ergeben, und die so erhaltenen Matrizen mit je 58 Werten abgespeichert. Im nächsten Schritt werden zeilenweise die horizontalen Polynomwerte ermittelt, wobei die Funktionswerte der vertikalen Polynome als «Stützwerte» verwendet werden. Die so errechneten Zeilenwerte werden ganzzahlig gerundet und dann nur jene Werte ausgedruckt, die bei einem Sprung von einer ganzen Zahl zu einer anderen stehen. Jene Stellen, an denen ein Sprung von +0 nach -0 (oder umgekehrt)

stattfindet, werden mit \* (Asterisk) gekennzeichnet; desgleichen werden zur Randbegrenzung der 1. und der 58. Wert gedruckt. Dieses Verfahren wird für alle 58 Zeilen nacheinander durchgeführt und dann die nächste Datenkarte verarbeitet (Beispiel in Figur 2).

**Diskussion.** Der zeilenweise Ausdruck wurde gewählt, weil 1) dadurch während des Drucks der Computer bereits die Werte der nächsten Zeile errechnen kann und 2) durch den Wegfall der Notwendigkeit, die gesamte Wertematrix speichern zu müssen, der Speicherplatzbedarf außerordentlich verringert wird. Der Umstand, dass aufgrund dieser Vorgangsweise Verbindungsstücke innerhalb von Potentiallinien auftreten können, scheint dadurch mehr als kompensiert.

Das Verfahren wurde in einer Arbeit von PETSCHÉ, RAPPELSBERGER und TRAPPL<sup>3</sup> angewandt; es ist geplant, durch Speicherung des Spannungsverlaufes auf einem Magnetbandspeicher und unmittelbare Digitalisierung mittels eines Analog-Digitalwandlers die Datenaufbereitung zu vereinfachen. Eine gleichzeitige Verarbeitung («real-time processing») erweist sich wegen des ungünstigen Verhältnisses von Registrierintervallzeit und Rechenzeit mit den zugänglichen Anlagen als noch nicht möglich<sup>4</sup>.

**Summary.** A computer program is presented which transforms simultaneous recordings of multiple electrodes into graphical approximate representations of isopotential lines.

R. TRAPPL

*Institut für allgemeine und vergleichende Physiologie  
der Universität, A-1090 Wien (Österreich),  
10. September 1969.*

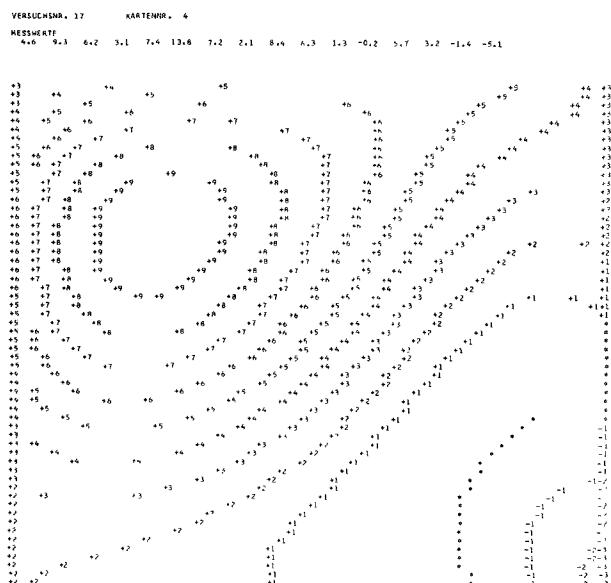


Fig. 2. Beispiel eines Ausdruckes.

<sup>3</sup> H. PETSCHÉ, P. RAPPELSBERGER and R. TRAPPL, *Electroenceph. clin. Neurophysiol.*, in press.

<sup>4</sup> Das Computer-Zentrum der Medizinischen Fakultät der Universität Wien ermöglichte in dankenswerter Weise die Benutzung seiner elektronischen Rechenanlage IBM/360, Modell 30.

## Verbesserte Methode zur Gewinnung und Verarbeitung von freien Zellen aus kleinsten Volumina von Körperflüssigkeiten mittels Membranfiltration

Die zytologische Untersuchung der in Körperflüssigkeiten unter normalen und pathologischen Bedingungen vorkommenden Zellen (= exfoliative Zytologie) hat sich, vor allem seit Einführung der sogenannten *Membranfilter-Technik*<sup>1-3</sup>, zu einem Routine-Verfahren der klinischen Medizin<sup>4-9</sup> entwickelt. Bei der «Membranfiltration» werden die Zellen einer Körperflüssigkeit (Kammerwasser, Liquor cerebrospinalis, Punktate aus Körperhöhlen und Organen, Rachen-, Magen- und Colon-Spülungen, Urin usw.) auf einem Filter mit genau definierter Porengröße aufgefangen und auf diesem direkt bis zur mikroskopischen Analyse weiterverarbeitet. Hinsichtlich Reproduzierbarkeit der Resultate, des Arbeitsaufwandes und der Einfachheit in der praktischen Ausführung, ist dieses Verfahren zur Zell-Anreicherung den früher ausschliesslich angewandten Methoden der Zell-Zentrifugation und Zell-Sedimentierung<sup>10,11</sup> eindeutig überlegen.

Sind für eine exfoliativ-zytologische Untersuchung grössere Mengen einer Körperflüssigkeit verfügbar, oder weist letztere eine hohe Konzentration an geformten

Elementen auf, so bietet die Durchführung einer Zell-Filtration mittels der handelsüblichen Geräte keine Pro-

<sup>1</sup> Techniques for exfoliative Cytology. Application Data Manual ADM 50, 1964. Millipore Filter Corporation, Bedford (Mass. USA).

<sup>2</sup> Cytology with the Gelman Membrane Filter sample screening technique. Tech. Bulletin Nr. 301, May 1965. Gelman Instrument Company, Ann Arbor (Mich. USA).

<sup>3</sup> General Electric Nuclepore Filters, Application Handbook: Techniques for exfoliative Cytology, 1969 (Arthur Thomas Company, Philadelphia, PA., USA).

<sup>4</sup> K. JUNIPER und C. L. CHESTER, *Cancer* 12, 278 (1959).

<sup>5</sup> J. W. MERRITT, W. B. HENDERSON und T. A. SLATE, *J. Urology* 82, 396 (1959).

<sup>6</sup> R. J. THABET und H. E. KNOERNNSCHILD, *Am. J. clin. Path.* 34, 185 (1960).

<sup>7</sup> W. A. BLANC und R. GAETZ, *Pediatrics* 29, 61 (1962).

<sup>8</sup> G.S. KÄSTLER und A. BISCHOFF, *Schweiz. med. Wschr.* 92, 863 (1962).

<sup>9</sup> E. METZEL, *Z. ges. Neurol. Psychiat.* 204, 222 (1963).

<sup>10</sup> J. SAYK, *Ärztl. Wschr.* 1024 (1954).

<sup>11</sup> A. BISCHOFF, *Schweiz. med. Wschr.* 90, 479 (1960).