

entraîné au cours de la séparation chimique; ces quantités entraînées ont été déterminées par des mesures d'absorption et les activités correspondantes sont portées dans les colonnes 10 et 13. Dans la colonne 14, sont indiquées les activités totales ( $^{45}\text{Ca}$  et  $^{32}\text{P}$ ) retrouvées après chacune des séparations chimiques. Chacune des valeurs indiquées dans le tableau est une moyenne des résultats obtenus au cours de trois ou quatre opérations.

Un examen d'ensemble du tableau montre que les quantités totales de radiocalcium et de radiophosphore retrouvées dans les différentes fractions représentent bien les quantités mises en expérience. De plus, quelque soit le mode de séparation chimique adopté, une partie du radioisotope échappe à la séparation chimique quand la quantité de support n'est pas suffisante. Enfin, il n'y a pas de radioactivité entraînée dans le cas des solutions *E* et *G*, ce qui prouve que les valeurs observées pour les autres solutions ne peuvent pas s'expliquer par une contamination survenue au cours de la manipulation.

De l'ensemble de ces résultats, nous pouvons conclure que dans le cas de faibles quantités de calcium ou de phosphore stable, on obtient de meilleurs résultats, pour le dosage des radioisotopes correspondants, en adoptant la méthode basée sur la mesure d'absorption du rayonnement émis. Cette dernière méthode présente un autre avantage sérieux en faisant réaliser un gain de temps appréciable puisqu'elle supprime les très longues séparations chimiques. Enfin, signalons que le principe de cette méthode de dosage peut être appliqué aussi pour l'utilisation simultanée d'autres isotopes radioactifs.

En terminant, je tiens à remercier bien vivement M. le Prof. G. GUÉBEN pour l'aide que je lui dois. Mes remerciements vont également à Mles N. GRISARD et T. VOSSIUS pour l'aide technique reçue au cours de la réalisation de ce travail.

JEAN GOVAERTS

Institut de physique nucléaire de l'Université de Liège (Belgique), le 28 mars 1951.

#### Summary

A method is described by means of which radiocalcium and radiophosphorus can be used simultaneously in biological tracer work. The chemical separation is eliminated when the different beta energies of these two isotopes are used. An aluminium absorber of 0.5 mm stops all of the  $^{45}\text{Ca}$ - $\beta$ -rays, but reduces the activity of the  $^{32}\text{P}$  by a factor of about 2.7. A sample containing both isotopes is first measured without absorber, giving the activity due to both isotopes; the activity measured with absorber multiplied by 2.7, will give the  $^{32}\text{P}$  contribution; the  $^{45}\text{Ca}$  contribution is then calculated from the difference.

#### Die Ausschaltung des Azetessigsäurefehlers bei der Brenztraubensäurebestimmung

Die auf dem Prinzip der Hydrazonbildung mit dem 2,4-Dinitrophenylhydrazinreagens beruhende Nachweismethode für Brenztraubensäure (BTS) nach LU<sup>1</sup>, KLEIN<sup>2</sup>, FRIEDEMANN und HAUGEN<sup>3</sup> und anderen Autoren hat den Nachteil, daß die Reaktion für diese  $\alpha$ -Ketosäure nicht spezifisch ist. Es reagieren vielmehr noch eine ganze Anzahl von anderen im Blut vorkommenden  $\alpha$ -Ketosäuren, aber auch einige  $\beta$ -Ketosäuren unter Bil-

dung eines gefärbten 2,4-Dinitrophenylhydrazons. In der Literatur ist schon wiederholt darauf aufmerksam gemacht worden, daß speziell die Azetessigsäure als quantitativ am stärksten ins Gewicht fallende  $\beta$ -Ketosäure bei der Bestimmung der BTS stört. Deshalb wurden verschiedene Verfahren zur Eliminierung der Azetessigsäure ausgearbeitet. FRIEDEMANN und HAUGEN halten es für ausreichend, das trichloressigsäure Blutfiltrat über Nacht im Eis stehenzulassen, um den angeblich geringen Störungseffekt der Azetessigsäure zu beseitigen. KLEIN benützt zur Enteiweißung Wolframat-Schwefelsäure statt Trichloressigsäure und läßt das mit Äthylazetat extrahierte Hydrazon über Nacht stehen. ELGART und NELSON<sup>4</sup> kochen nach Enteiweißung mit Wolframat-Schwefelsäure das Filtrat unter Zusatz von konzentrierter Salzsäure eine Stunde lang im Wasserbad. Dasselbe Verfahren, in leicht modifizierter Form, benutzen LESTRADET und GUEST<sup>5</sup>.

Wir haben uns im Zusammenhang mit unseren Untersuchungen über den BTS-Stoffwechsel bei der diabetischen Azidose die Frage vorgelegt, in welchem Maße die Azetessigsäure bei der BTS-Bestimmung nach FRIEDEMANN und HAUGEN Fehler verursachen kann. Die aus diesem Grunde vorgenommenen Bestimmungen zur Feststellung der Hydronbildung aus Azetessigsäure in wässriger Lösung sowie bei Zusatz zu Blut sind in der Tabelle I zusammengestellt.

Untersucht wurde der Dosenbereich von 100–1000  $\gamma$ , das entspricht etwa einem Azetessigsäuregehalt des Blutes von 10–100 mg %. Wie die erhaltenen Werte zeigen, werden in wässriger Lösung zwischen 6,0 und 7,1% schwankende Azetessigsäuremengen als BTS nachgewiesen. Im Zusatzversuch zu Blut liegen die Werte mit 6,6 bis 8,0% etwas höher. Da bei der diabetischen Azidose eine stärkere Vermehrung der Azetessigsäure regelmäßig vorkommt, bedeutet die Ausschaltung dieses Fehlers bei der Bestimmung der BTS eine unbedingte Notwendigkeit.

Das von ELGART und NELSON vorgeschlagene Verfahren des einstündigen Kochens unter Zusatz von konzentrierter Salzsäure schien uns wegen der bekannten Empfindlichkeit der Ketosäuren gegen starke chemische Eingriffe ungeeignet. Wenn man das Blutfiltrat 1 Stunde lang der Hydrolyse in stark saurer Lösung bei 100° aussetzt, besteht die Gefahr unkontrollierbarer und tiefgreifender Zerstörungs- und Umwandlungsprozesse, die die nachfolgende Reaktion mit Dinitrophenylhydrazin unübersichtlicher machen.

Da anderseits die Azetessigsäure durch starke Zersetzung (unter Bildung von Azeton und Kohlensäure) in saurer Lösung beim Erwärmen charakterisiert ist, haben wir versucht, mit einer kürzeren Kochzeit auszukommen. Außerdem haben wir auf einen besonderen HCl-Zusatz verzichtet, denn bei der Enteiweißung mit Trichloressigsäure besteht bereits ein pH von 1. Diese Versuche ergaben das vollständige Verschwinden der Azetessigsäure schon nach 5 Minuten dauerndem Einstellen in kochendes Wasser (siehe Tabelle I). Papierchromatographische Nachprüfung hat ergeben, daß bei diesem Verfahren tatsächlich alle Azetessigsäure zerstört wird.

Weiter erhob sich die Frage, ob durch das fünfminutige Erwärmen auch Verluste an BTS verursacht werden. In Tabelle II und III sind die gefundenen Werte vor und nach der Kochprozedur angegeben. Es zeigt sich sowohl für die wässrige Lösung als auch für den BTS-Zusatz zum Blut, daß der Kochverlust unter 10 % beträgt. Wir

<sup>1</sup> G. D. LU, Biochem. J. 33, 249 (1939).

<sup>2</sup> D. KLEIN, J. Biol. Chem. 137, 311 (1941).

<sup>3</sup> T. E. FRIEDEMANN und G. E. HAUGON, J. Biol. Chem. 147, 415 (1943).

<sup>4</sup> S. ELGART und N. NELSON, J. Biol. Chem. 138, 443 (1941).

<sup>5</sup> H. LESTRADET und G. M. GUEST, Presse méd. 59, 375 (1951); Ann. Biol. Clin. 9, 183 (1951).

Tabelle I

Hydrazonebildung aus azetessigsaurem Natrium in wässriger Lösung und bei Zusatz zu Blut

Einwaage in azetessig- saurem Natrium	Als BTS direkt		Als BTS in % der ein- gewogenen Azetessigsäure		BTS nach Kochen
	in wäs- seriger Lösung mg %	bei Zusatz zu Blut mg %	in wäs- seriger Lösung	bei Zusatz zu Blut	
100	0,65	0,72	6,5	7,2	–
200	1,26	1,60	6,3	8	–
300	2,04	2,20	6,8	7,3	–
400	2,76	3,10	6,9	7,7	–
500	3,10	3,30	6,2	6,6	–
600	3,60	5,00	6,0	8	–
700	4,54	5,40	6,4	7,7	–
800	5,66	6,10	7,1	7,7	–
900	6,32	6,50	7,0	7,2	–
1000	6,66	7,50	6,7	7,5	–

Tabelle II

Hydrazonebildung aus BTS, ohne und mit fünfminutigem Kochen, in wässriger Lösung

BTS direkt mg %	BTS nach Kochen mg %	Verlust %
0,96	0,88	8,3
2,08	1,93	7,2
2,98	2,70	9,4
4,14	3,92	5,3
4,95	4,85	2,0

Tabelle III

Hydrazonebildung aus BTS, ohne und mit fünfminutigem Kochen, BTS-Zusatz zu Normalblut

	BTS direkt mg %	BTS nach Kochen mg %	Verlust %
Blut allein . .	1,2		
BTS-Zusatz, abzüglich Blutwert . .	1,1 2,8 5,4 10,4	1,1 2,7 5,1 9,6	0 3,6 5,6 7,7

glauben also, mit dem sehr einfachen Verfahren des 5 Minuten dauernden Siedens des trichloressigsauren Filtrates vor dem Zusatz des 2,4-Dinitrophenylhydrazins

einen zuverlässigen Weg zur Ausschaltung des Azetessigsäurefehlers bei der BTS-Bestimmung gefunden zu haben. Im folgenden wird der von uns angewendete genaue Untersuchungsgang beschrieben, der im Prinzip der Methode nach FRIEDEMANN und HAUGEN entspricht.

#### Methode

1 cm<sup>3</sup> ungeronnenes Vollblut (Liqueminzusatz stört nicht, sehr genaue Abmessung erforderlich) wird sofort nach der Blutentnahme mit 5 cm<sup>3</sup> 10prozentiger Trichloressigsäure zwecks Enteiweißung mit Glasstab gut durchmischt. Zentrifugieren. Anschließend wird das klare Zentrifugat in einem kleinen Reagensglas in kochendes Wasser verbracht und 5 Minuten am Sieden erhalten. Nach Abkühlung werden 3 cm<sup>3</sup> des Zentrifugates mit 1 cm<sup>3</sup> einer 0,1prozentigen 2,4-Dinitrophenylhydrazinlösung (das Hydrazin wird mit 2 n HCl gelöst) im kleinen Schütteltrichter versetzt und 5 Minuten reagieren gelassen (Zeit genau einhalten!). Anschließend Zugabe von 3 cm<sup>3</sup> reinstem Toluol. 1 Minute kräftig durchschütteln, stehenlassen bis zur Trennung von Toluolextrakt und wässriger Lösung. Verwerfung der wässrigen Phase. Dem Toluolextrakt werden 6 cm<sup>3</sup> 10prozentige Natriumkarbonatlösung zugesetzt, dann wird wiederum 45 Sekunden kräftig geschüttelt. Die Trennung der Phasen wird abgewartet, dann erfolgt Filtrierung der wässrigen Phase in ein Reagensröhrchen. 3 cm<sup>3</sup> des Filtrates werden mit 3 cm<sup>3</sup> Natriumkarbonatlösung in einem 50-cm<sup>3</sup>-Erlenmeyerkölbchen verdünnt. Dieser Lösung werden vor der photometrischen Ablesung 5 cm<sup>3</sup> 2 n Natronlauge zugesetzt, wodurch Rotfärbung auftritt. Nach 5 Minuten Stehenlassen wird photometriert (am Lumetron Blau-Grün-Filter Nr. 490 benützen, am Pulfrich-Photometer Filter S 47).

Es ist notwendig, vor Beginn der BTS-Bestimmung im Blut eine Eichkurve mit reinstem Natriumpyruvat oder reinster, frisch destillierter BTS aufzunehmen. Die Lösungen bei der Bestimmung der Eichkurve werden ebenso behandelt wie das Blut.

S. MARKEES

Wissenschaftliches Laboratorium der Firma Hoffmann-La Roche, Basel, den 21. April 1951.

#### Summary

In the presence of aceto acetic acid the evaluation of pyruvic acid with 2,4-dinitrophenylhydrazin is disturbed because 6–8 % of aceto acetic acid are determined as coloured hydrazone with the usual method. The elimination of aceto acetic acid can be obtained by putting the filtrate after deproteinization with trichloracetic acid into boiling water during 5 minutes. Less than 10 % of pyruvic acid are destroyed by this procedure.

## Informations - Informationen - Informazioni - Notes

### STUDIORUM PROGRESSUS

#### The Relative Stability of Stereoisomeric Forms of Fused Ring Systems

By WILLIAM S. JOHNSON<sup>1</sup>

The method of conformational analysis as applied so fruitfully to the steroids by BARTON<sup>2</sup> can be extended to

rationalize the relative stability of certain fused ring systems. The premise that the cyclohexane ring is significantly more stable in the chair than the boat form, and that substituents on the ring are more stable in the equatorial (*e*) than the polar (*p*) conformation is now well accepted<sup>1</sup>. As has already been pointed out<sup>1</sup>, in 1,2-disubstituted cyclohexanes it is possible for both substituents to be equatorial only when they have the trans configuration, while with the substituents cis it is necessary that one of them assume a polar conformation;

<sup>1</sup> Dep. of Chemistry, University of Wisconsin, Madison, Wisc., U.S.A.

<sup>2</sup> D. H. R. BARTON, Exper. 6, 312 (1950).

For a summary of evidence see ref. 2.