

obtained from VIII in a more simple manner than from I. The mechanism of formation of the intermediate XII is self-explanatory and the conversion of XII to XIII has been already discussed in detail in our recent paper¹.

Thus, we find that the ryanodol formula VIII explains all rigorously established degradation series (anhydro, monoseco, trisecho) in a remarkably simpler manner than the ryanodol formula I. It has to be consequently considered that the series of isoryanodol which in its present formulation¹ is completely incompatible with formula VIII may be misleading and incorrectly formulated.

Also, the complex NMR data on ryanodine and ryanodol which favour oxygen substitution on all carbons of ring A (formula I)¹ have to be weighed against the simpler chemical pathways provided by formula VIII.

Zusammenfassung. Die Orthoesterstruktur VIII erklärt die Bildung der Verbindungen IV, VI und XIII, deren Struktur einwandfrei gesichert ist, auf eine ausserordent-

lich einfache Art und kann deswegen als eine Möglichkeit für Ryanodol nicht ausgeschlossen werden.

J. ŠANTROCH, Z. VALENTA,
and K. WIESNER

Department of Chemistry, University of New Brunswick,
Fredericton (New Brunswick, Canada),
August 30, 1965.

¹ D. R. BABIN, T. BÖGRI, J. A. FINDLAY, H. REINSHAGEN, Z. VALENTA, and K. WIESNER, *Exper.* 27, 425 (1965).

² D. R. BABIN, T. P. FORREST, Z. VALENTA, and K. WIESNER, *Exper.* 18, 549 (1962). – See also K. WIESNER, XIXth International Congress of Pure and Applied Chemistry, London (Butterworths, 1963), p. 285.

³ D. R. BABIN, J. A. FINDLAY, T. P. FORREST, F. FRIED, M. GÖTZ, Z. VALENTA, and K. WIESNER, *Tetrahedron Letters* No. 15, 31 (1960).

⁴ R. B. WOODWARD, Special Lecture at the 3rd International Symposium on Chemistry of Natural Products at Kyoto (Japan) (Butterworths, London 1964), p. 49.

PRO EXPERIMENTIS

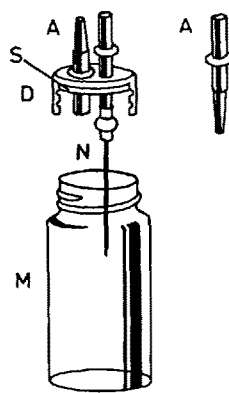
Eine einfache Technik für die Absorption von $^{14}\text{CO}_2$ und dessen direkte Messung im Flüssigkeits-Szintillationszähler

Seit Einführung der Flüssigkeits-Szintillationszählung werden bei Stoffwechseluntersuchungen mit ^{14}C -markierten Substanzen nicht-wässrige CO_2 -Absorptionsgemische bevorzugt¹⁻⁴, welche nach dem Zusatz eines Szintillators direkt im Szintillationszähler gemessen werden können. In Stoffwechselapparaturen für kleine Tiere^{4,5}, Apparaturen für die Perfusion isolierter Organe⁶, sowie für Inkubationsversuche⁷, bietet die direkte Verwendung von Messgläsern für den Szintillationszähler als CO_2 -Absorptionsgefässe grosse Vorteile.

In diesem Laboratorium hat sich folgendes Vorgehen bewährt (vgl. Figur): Der Deckel (D) des Messgläschens für den Szintillationszähler (Packard Instrument Co., Inc.) wird mit 2 symmetrisch angeordneten Bohrlöchern von 4,0 bzw. 4,4 mm Durchmesser, in einem Abstand von 6 mm, versehen. In den Bohrlöchern werden 2 Polyamid-ansatzstücke (A) für Infusionsnadeln⁸ befestigt⁹; das konische Ende ist bei dem einen nach aussen (4,4 mm-Loch), bei dem andern nach innen (4,0 mm-Loch) gerichtet. An letzterem wird eine 50 mm lange Injektionsnadel No. 1 (N) angesetzt, die als Eingangsrohr des Absorptionsgefässes dient. Anstelle der Korkdichtung wird im Deckel (D) eine entsprechend zweifach gebohrte, 1,5 mm dicke Scheibe (S) aus weichem Gummi eingeklebt. In das Messgläschen (M) werden 11 ml eines CO_2 -Absorptionsgemisches (Tabelle I) pipettiert.

Vor dem Schliessen wird der Rand des Messgläschens zur besseren Abdichtung mit Vaseline dünn bestrichen. Das durchströmende Gas muss mittels einer Kühl- oder Schwefelsäurefalle von Wasserdampf befreit werden. Bei Verwendung von methanolhaltigen Absorptionsgemischen kann die Menge des abdampfenden Methanols durch Sättigung des Gassstromes aus einer unmittelbar vorgeschalteten Methanolfalle in der Grössenordnung von 1–2%

gehalten werden. Eine Abnahme des Methanolgehaltes um weniger als 5% hat keinen feststellbaren Einfluss auf die Zählausbeute. Vor der Messung im Szintillationszähler wird dem Absorptionsgemisch eine Szintillatorlösung (Tabelle I) zugesetzt und die Probe wird mit einem Originaldeckel verschlossen.



Schematische Darstellung des Absorptionsgefässes. A, Ansatzstück aus Polyamid. S, Scheibe aus weichem Gummi. D, Deckel. N, Injektionsnadel. M, Messgläschen für den Szintillationszähler.

¹ J. M. PASSMANN, N. S. RADIN und J. A. D. COOPER, *Anal. Chem.* 28, 484 (1956).

² R. A. OPPERMAN, R. F. NYSTROM, W. O. NELSON und R. E. BROWN, *Int. J. appl. Radiat. Isotopes* 7, 38 (1959).

³ H. JEFFAY und J. ALVAREZ, *Anal. Chem.* 33, 612 (1961).

⁴ M. BAGGIOLINI, H. AEBI, E. SACQUET und H. CHARLIER, *Helv. physiol. Acta* 22, 53 (1964).

⁵ H. AEBI, E. FREI, R. KNAB und P. SIEGENTHALER, *Helv. physiol. Acta* 15, 150 (1957).

⁶ M. BAGGIOLINI, unveröffentlichte Methode.

⁷ M. BAGGIOLINI und M. H. BICKEL, *Anal. Biochem.*, im Druck.

⁸ Bestandteil des Infusionsbesteckes SRK (beim Autor erhältlich).

⁹ Gelebt mit Araldit, CIBA.

CO₂-Absorptionsgemische für den Szintillationszähler bestehen aus einer organischen Base und einem stark polaren organischen Lösungsmittel, das als Lösungsvermittler zwischen der Base und dem schwach polaren Szintillator dient. Der Lösungsvermittler muss ein möglichst gutes Reaktionsmedium für die Base sein, schwache Quench-Effekte aufweisen und die Aufnahme einer relativ grossen Menge CO₂-beladener Base im Messgemisch ermöglichen. Das beschriebene Absorptionsgefäss wurde mit verschiedenen CO₂-Absorptionsgemischen in Veratmungsversuchen vergleichend geprüft. Als ¹⁴CO₂-Quelle dienten ¹⁴C-Formiat-belastete Ratten⁴. Die Ausatemungsluft wurde für die Dauer von 15, 30 und 60 min durch Dreiergruppen von Absorptionsgefässen geleitet und die Radioaktivität derselben jeweils getrennt gemessen (vgl. Tabelle II).

Aus Tabelle II geht hervor, dass unter geeigneten Versuchsbedingungen bereits ein einziges der beschriebenen

Absorptionsgefässe zur quantitativen Bindung des im durchströmenden Gas enthaltenen ¹⁴CO₂ genügt. Bei Verwendung von zwei hintereinandergeschalteten Absorptionsgefässen lässt sich die Konzentration der Base verringern und dadurch die Zählausbeute des Gemisches erhöhen. Unter den getesteten CO₂-Absorptionsgemischen (Tabelle I) sind I, II, IV und V für die angegebene Technik geeignet; die geringe CO₂-Bindungskapazität von III^{3,11} ist bei längeren Absorptionszeiten von Nachteil.

Die vorgeschlagene Technik hat gegenüber früher angewandten Methoden zwei wesentliche Vorteile: (1) Die

¹⁰ F. KALBERER und J. RUTSCHMANN, *Helv. chim. Acta* **44**, 1569 (1961).
¹¹ J. S. AMENTA, A. M. DOMINGUEZ and *Toxicol. appl. Pharmacol.* **7**, 236 (1965).

Tabelle I. Zusammensetzung der untersuchten CO₂-Absorptions- und Szintillatormischungen^a

Bezeichnung	CO ₂ -Absorptionsgemisch Totalvolumen 11 ml	Szintillatormisch (vor der Messung zugesetzt)
I	Äthanolamin/Methanol (v/v = 20/80)	10 ml Szintillator
II	Äthanolamin/Methanol (v/v = 30/70)	10 ml Szintillatormisch: Szintillator/Methanol (v/v = 85/15)
III	Äthanolamin/Äthylenglykolmonomethyläther/Szintillator (v/v = 10/70/30)	7 ml Szintillator
IV	Äthanolamin/Äthylenglykolmonomethyläther (v/v = 20/80)	10 ml Szintillator
V	Äthanolamin/Äthylenglykolmonomethyläther (v/v = 30/70)	10 ml Szintillatormisch: Szintillator/Äthylenglykolmonomethyläther (v/v = 85/15)

^a Material: Äthanolamin puriss. p.a. «Fluka», Methanol zur Analyse «Merck», Äthylenglykolmonomethyläther zur Synthese «Merck». Szintillator¹⁰: 4,0 g PPO, 0,1 g POPOP (Packard Instrument Co., Inc.) ad 1000 ml Toluol zur Analyse «Merck».

Tabelle II. Vergleichende Prüfung verschiedener CO₂-Absorptionsgemische. Die Radioaktivitätsmessungen wurden im TRI-CARB Flüssigkeits-Szintillationszähler (Modell 314 EX, Packard Instrument Co., Inc.) durchgeführt. Jede Probe wurde fünfmal während 1 min gemessen (optimale Hochspannung: G₁, G₂ = 10; W₁, W₂ = 10–75)

Art des verwendeten Absorptions- gemisches (vgl. Tabelle I)	Zeit der CO ₂ - Absorption ^a in min	Anzahl Versuche	Radioaktivität der drei hintereinander geschalteten Absorptionsgefässe in % der insgesamt absorbierten ¹⁴ CO ₂ -Aktivität Mittel ± Standardabweichung			Relative Zählausbeute (Zählausbeute in III = 100%)
			1.	2.	3.	
I	15	6	99,82 ± 0,19	0,18 ± 0,19	0	89
	30	10	99,61 ± 0,13	0,39 ± 0,13	0	
	60	9	98,54 ± 0,54	1,46 ± 0,54	0	
II	60	8	99,53 ± 0,13	0,47 ± 0,13	0	76
III	15	4	97,87 ± 0,25	2,13 ± 0,25	0	100
	30	9	94,00 ± 2,86	5,87 ± 2,81	0,28	
	60	9	54,35 ± 4,49	42,10 ± 2,07	3,55 ± 1,98	
IV	30	5	98,74 ± 0,59	1,26 ± 0,59	0	90
	60	7	97,52 ± 2,39	2,39 ± 2,24	0,09	
V	60	7	99,14 ± 0,36	0,86 ± 0,36	–	76

^a Gasfluss 70–90 ml/min, CO₂-Gehalt des Gases ca. 3% (entspr. ca. 100 µMol CO₂/min), Temperatur 20°C.

direkte Absorption von $^{14}\text{CO}_2$ im Messgläschen für die Szintillationszählung. (2) Die Messung des insgesamt absorbierten $^{14}\text{CO}_2$, was die Erfassung sehr geringer Mengen ermöglicht. Im Vergleich zu dem kürzlich von AMENTA und DOMINGUEZ¹¹ angegebenen Typ, ist das beschriebene Absorptionsgefäß in Konstruktion und Handhabung bedeutend einfacher¹².

Summary. A novel and simple kind of $^{14}\text{CO}_2$ trap is described. It can be used directly for subsequent scintilla-

tion counting. Solutions for optimal absorption and counting efficiency are indicated.

M. BAGGIOLINI

Medizinisch-chemisches Institut der Universität Bern (Switzerland), 17. August 1965.

¹² Der Autor dankt Herrn W. SCHULTHEISS für technische Hilfe.

Dengue-Like Viruses Isolated by an Improved Method

Antibodies for dengue viruses were demonstrated in the sera of patients with dengue-like fever in Jamaica during an outbreak in 1963 by GRIFFITHS and GRANT¹. After many unsuccessful attempts to isolate the etiological agent in suckling mice, the following method was used with success.

The infectious material examined was the acute sera of patients with dengue-like fever which showed a significant rise of dengue antibodies in their convalescent sera. For the isolation, Roux bottles containing 8–10 million Bristol HeLa cells in monolayers were used. After inoculation of the serum, the cells were maintained in Eagle's medium with the addition of 2% calf serum. The maintenance medium was replaced with fresh medium at 5-day intervals. The medium collected was stored at – 20°C. The bulk of the cell culture medium collected from the same Roux bottle of inoculated cells was twice extracted with 20 Vol of acetone and dried with a vacuum pump. After the evaporation, the cell culture medium was reconstituted to the original volume with borate buffered saline, pH 9. The reconstituted cell culture medium was concen-

trated up to 150 times by the use of ultrafilter LKB 6300 A as described previously². In the final preparation, the hemagglutinins were demonstrated with goose red blood cells according to techniques described by CLARKE and CASALS³.

In the cell culture fluid of Bristol HeLa cells inoculated with the sera of two patients with dengue-like fever in 1963, hemagglutinins could be demonstrated by the use of the method described above. The optimal titres of hemagglutinins demonstrable in the concentrated and acetone-extracted cell culture fluids, were obtained at pH 6.6. HeLa cell culture fluids containing hemagglutinins were infectious for fresh Bristol HeLa cells in monolayers. Table I shows the titres of hemagglutinins in cell culture fluids for three passages of the two virus strains isolated.

By the use of cross complement fixation it could be shown that the two viruses isolated in Bristol HeLa cell cultures belong to the group of dengue viruses. Virus strains FV 1088 and FV 1119 are closely related to dengue type 3 and dengue type 4 viruses, as can be seen from Table II. The final preparations of hemagglutinins were used in the complement fixation test as antigens.

BUCKLEY demonstrated on many occasions^{4,5} that HeLa cells can be used successfully for the growth of dengue virus types 1–4. We believe that the method described in the present report could be used as a valuable expedient for the isolation of dengue viruses. The comparative ease with which hemagglutinins are prepared by our method offers new possibilities for the identification and the isolation of dengue viruses.

Zusammenfassung. Aus Seren von Dengue-Fieberkranken (Epidemie 1963) wurden zwei «Dengue-like» Viren isoliert. Die Isolierung der Stämme gelang in Bristol-HeLa-Zellen, die mit dem LKB 6300 A Ultrafilter dargestellt wurden. Die Identifizierung der Viren erfolgte mit der Reaktion der Komplementbindung.

M. S. LIKAR, DOROTHY S. KING,
E. A. BELLE, and L. S. GRANT

Institute of Microbiology, University of Ljubljana and Department of Microbiology, University of the West Indies, Kingston (Jamaica), July 5, 1965.

Table I. Titres of hemagglutinins in the HeLa cell culture medium inoculated with the sera FV 1088 and FV 1119

Passage level	Day after inoculation	Titres of hemagglutinins at pH 6.6	
		FV 1088	FV 1119
1	5	< 10*	< 10
	15	160	40
2	5	< 10	< 10
	25	40	40
3	5	10	< 10
	15	40	40

* Figures denote the mean titres of four titrations in reciprocal values.

Table II. The results of the cross complement fixation test for the virus strains FV 1088 and FV 1119

Antigens	Serum			
	Dengue 1	Dengue 2	Dengue 3	Dengue 4
Dengue 2	< 2/< 2	32/256	< 2/< 2	< 2/< 2
FV 1088	< 2/< 2	4/4	8/32	8/8
FV 1119	4/8	< 2/< 2	16/64	8/32

¹ B. B. GRIFFITHS and L. S. GRANT, personal communication.
² M. LIKAR, S. M. BUCKLEY, and D. H. CLARKE, *Virology* 18, 647 (1962).
³ D. H. CLARKE and J. CASALS, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 7, 561 (1958).
⁴ S. M. BUCKLEY, *Nature* 192, 778 (1961).
⁵ S. M. BUCKLEY and S. SRIHONGSE, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 113, 284 (1963).