

specimens subjected to high temperatures. The inference may be drawn that the high temperature accelerates, to a slight degree, the internal process by which the angle of orientation is determined: the internal time-measuring apparatus of the animals subjected to high temperatures is thus in advance when compared with that of the controls.

Further experiments are being carried out. At present the results obtained appear to prove the following points:

(a) As has been assumed, and in accordance with what HOFFMANN has established for Birds, the adjustment of the angle of orientation in *Talitrus* and *Talorchestia* is based on an endogenous factor, i.e. on physiological processes having a daily rhythm ("innere Uhr", "Zeitsinn")¹.

(b) It is possible, also in the case of *Talitrus* and *Talorchestia*, to influence these processes by altering the period of illumination; and this alteration takes place even if temperature conditions remain unchanged.

¹ F. PAPI, following a different method, comes to the same conclusion (*vide* this same volume).

(c) It is possible to determine a perceptible change in the line of escape by exposing the animals to comparatively higher temperatures before investigating the direction in which they escape.

L. PARDI and M. GRASSI

Zoological Institute of the University of Turin (Italy),
October 29, 1954.

Riassunto

Talitrus saltator (Montagu) e *Talorchestia deshayesii* (Aud.) (Crustacea-Amphipoda), allontanati dalla sabbia umida della spiaggia, sono in grado di ritornarvi, mantenendo una direzione di fuga praticamente costante in base alla posizione azimutale del Sole. La regolazione dell'angolo di orientamento col Sole nel corso del giorno è basata sul senso del tempo, come dimostrano esperienze simili a quelle recentemente eseguite da HOFFMANN per gli Storni. È possibile ottenere una significativa deviazione della direzione di fuga, sottoponendo gli animali a temperature relativamente alte prima di saggiare il loro orientamento.

Informations - Informationen - Informazioni - Notes

STUDIORUM PROGRESSUS

Über die Genauigkeit der Brenztraubensäure-Bestimmung als 2,4-Dinitrophenylhydrazon

Vergleich der direkten kolorimetrischen mit der quantitativ-chromatographischen Methode

Von S. MARKEES¹, Basel

Die Wichtigkeit zuverlässiger Nachweismethoden für die Brenztraubensäure (BTS) ist bei Betrachtung der in den letzten Jahren gewaltig angewachsenen Zahl von Arbeiten über dieses Stoffwechselprodukt unverkennbar. Dabei muss daran erinnert werden, dass für die früher unter die Gruppe der «bisulfitbindenden Substanzen» gerechnete und als solche quantitativ bestimmte Säure erst 1939 von LU² ein praktisch brauchbares Bestimmungsverfahren für das Blut entwickelt worden ist, das nach dem Prinzip der Umsetzung mit dem 2,4-Dinitrophenylhydrazin arbeitet. Durch FRIEDEMANN und HAUGEN³, nach deren Angaben die BTS heute ziemlich allgemein bestimmt wird, ist dieses Verfahren nur hinsichtlich des Extraktionsmittels - Toluol statt Essigester - abgeändert worden. Das mit der BTS gebildete

2,4-Dinitrophenylhydrazon ist in alkalischer Lösung rot gefärbt und gut kolorimetrierbar. Diese Reaktion ist naturgemäss unspezifisch, da alle α -Ketosäuren und teilweise auch einige β -Ketosäuren sich mit dem Reagens umsetzen. Über die Ausschaltung der wesentlichsten Fehlerquelle, der Azetessigsäure, durch kurzfristiges Erhitzen des Blutfiltrates vor dem Zusatz des 2,4-Dinitrophenylhydrazins haben wir früher berichtet¹. Den mit dem Aufkommen der Papierchromatographie in der Literatur² auftauchenden Zweifeln an der Genauigkeit der kolorimetrischen Bestimmung der BTS als 2,4-Dinitrophenylhydrazon sind wir dann gemeinsam mit GEY³ in einer Arbeit entgegengetreten, in der das direkte kolorimetrische Verfahren mit dem quantitativ-chromatographischen verglichen worden ist. Es hat sich damals eine ausreichende Übereinstimmung der gefundenen Absolutwerte ergeben. Nachdem aber neuerdings in der Literatur⁴ darüber berichtet worden ist, dass bei Verwendung einer fermentchemischen Methode mit Milchsäure-Dehydrogenase, die als spezifisch angesprochen wird, niedrigere Werte für die BTS gefunden werden als mit der 2,4-Dinitrophenylhydrazin-Methode, haben wir es für erforderlich gehalten, dieses Verfahren noch einmal sehr eingehend auf Genauigkeit, bzw. seine Spezifität zu überprüfen. Dabei hat sich vor allem die Notwendigkeit herausgestellt, die papierchromatographische Methode grundlegend neu zu bearbeiten und sie

¹ S. MARKEES, Exper. 7, 314 (1951).

² D. CAVALLINI, N. FRONTALI und G. TOSCHI, Nature 163, 568 (1949).

³ S. MARKEES und F. GEY, Helv. physiol. Acta 11, 49 (1953).

⁴ K. JOHANNESMEIER, H. REDETZKI und G. PFLEIDERER, Klin. Wschr. 32, 560 (1954).

¹ Aus den Medizinischen Laboratorien der F. Hoffmann-La Roche & Co. AG., Basel.

² G. D. LU, Biochem. J. 33, 249 (1939).

³ TH. E. FRIEDEMANN und G. E. HAUGEN, J. Biol. Chem. 147, 415 (1943).

im Rahmen der Gesamtdarstellung des gegenwärtigen Standes dieses Problems wiederzugeben.

Wie bereits verschiedentlich früher von uns beschrieben¹, zeigt das 2,4-Dinitrophenylhydrazon der BTS im Papierchromatogramm zwei scharf voneinander getrennte Flecke mit den Rf-Werten von 0,36 (A) und 0,57 (B). Diese beiden Flecken entsprechen nach den übereinstimmenden Feststellungen von STEWART² und ISHERWOOD und CRUICKSHANK³ isomeren Formen des Hydrazons. Sie bilden sich regelmässig, das heisst sowohl bei Verwendung von Pyruvatlösungen bekannter Konzentrationen als auch bei Umsetzung der im Blute befindlichen BTS mit dem Reagens. Andere bei der Chromatographie der 2,4-Dinitrophenylhydrazone auf dem Papier erscheinende Flecken, die zu einer Verwechslung mit den genannten Flecken A und B führen könnten, kommen bei der Chromatographie des Blutfiltrates nicht vor.

Das α -Ketoglutaräure-2,4-dinitrophenylhydrazon hat einen Rf-Wert von 0,12, das entsprechende Hydrazon der Oxalessigsäure einen Rf-Wert von 0,18; das 2,4-Dinitrophenylhydrazon der Azetessigsäure liegt zwischen den Flecken A und B mit einem Rf-Wert von 0,45, wird aber durch Erhitzen des Filtrates vor dem Umsetzen mit dem Reagens zersetzt und kommt gar nicht zur Darstellung. Überschüssiges 2,4-Dinitrophenylhydrazin ist infolge seines Rf-Wertes von 0,90 ebenfalls deutlich abgegrenzt.

Bei der Gewinnung des das BTS-2,4-Dinitrophenylhydrazon enthaltenden Extraktes sind wir ursprünglich folgendermassen vorgegangen: Enteiweissung des Blutes mit Na-Wolframat- H_2SO_4 ; Trichloressigsäure, die bei dem kolorimetrischen Verfahren benützt wird, ist hier unbrauchbar, weil starke Schlierenbildung auf dem Papier auftritt, wenn nachher Essigester zur Extraktion benützt wird. Umsetzen des während 5 min im kochenden Wasserbad gehaltenen und wieder abgekühlten Blutfiltrates mit einer gesättigten Lösung von 2,4-Dinitrophenylhydrazin während einer halben Stunde. Zwei- bis dreimalige Extraktion des Reaktionsgemisches mit Essigester, anschliessende Extraktion der Hydrazone mit 10%iger Natriumcarbonat-Lösung, Ansäuern mit konzentrierter HCl bis zu einem pH von etwa 2 in eisgekühlter Lösung, dann Extraktion mit Essigester, Verwerfen der wässrigen Phase, nach einmaligem Nachwaschen mit H_2O dest. Eindampfen zur Trockne, Auftropfen einer abgemessenen Menge auf Whatman-Nr.-1-Papier. Das Chromatogramm läuft 14 h aufsteigend in mit 3%igem Ammoniak gesättigtem Butanol. Trocknen des Papiers bei Zimmertemperatur. Abgrenzung der oben genannten Flecken A und B, Ausschneiden und feines Zerschneiden. Eluierung der Schnitzel mit bekanntem Volumen Carbonat für 2-3 h unter Schütteln, Abnutschen, Zusatz von 2n NaOH und Kolorimetrie nach etwa 2 min.

Wenn man nach dieser Vorschrift vorgeht und die erhaltenen Extinktionen mit denen vergleicht, die bei Anwendung der direkten Kolorimetrie gefunden werden, dann stellt man stark variierende Verluste bis zu 60% fest. Eine derart ungenau arbeitende Methode ist selbstverständlich zur Kontrolle der Zuverlässigkeit der direkten kolorimetrischen BTS-Bestimmung völlig ungeeignet. Unsere Bemühungen haben sich darum auf die Aufklärung der Ursachen für derart grosse und

schwankende Fehler bei der quantitativen papierchromatographischen Methode gerichtet. Wir haben dabei zunächst festgestellt, dass das 2,4-Dinitrophenylhydrazon der BTS licht- und temperaturempfindlich ist. Wurden die Reaktionen unter Ausschluss von Tageslicht und unter Vermeidung jeder längeren Erwärmung vorgenommen (speziell beim Eluieren der Papierschnitzel darf nicht im erwärmten Wasserbad geschüttelt werden), dann fielen die Ausbeuten bereits um 11-29% besser aus (Tabelle I). Folgende weitere Faktoren wurden variiert:

1. Verarbeitung des Blutfiltrates sofort und nach Stehenlassen für einige Zeit;
2. Verwendung von Plasma statt Vollblut;
3. Verlängerung der Reaktionszeit des Blutfiltrates mit dem 2,4-Dinitrophenylhydrazin;
4. Verlängerung der Ablesezeit nach dem NaOH-Zusatz;
5. Zusatz von Natriumpyruvat (zur Feststellung der Ausbeute) erst nach dem Enteiweissen.

Alle diese Variationen hatten auf das Endergebnis keinen Einfluss.

Tabelle I. Vergleich der bei direkter Kolorimetrie und bei quantitativer Chromatographie gewonnenen Werte.

a) Zusätze von BTS zu Blut und Ermittlung der Ausbeute nach einer Eichkurve, die durch Photometrie eingewogener Mengen fertigen Hydrazons gewonnen wurde.

| BTS-Zusätze zu Blut in γ/cm^3 | Gefunden, abzüglich Blutwert, γ/cm^3 | Ausbeute in % | Ausbeute verglichen mit direkter Methode |
|--------------------------------------|---|---------------|--|
| 10 | 8,6 | 86 | — |
| 20 | 16,3 | 81,5 | — |
| 30 | 24,6 | 82 | — |
| 50 | 40,2 | 80,5 | — |

b) Durchführung der Reaktionen bei Tageslicht und Eluierung des Hydrazons aus dem Papier mit Erwärmung.

| | | | |
|----|------|----|----|
| 10 | 4,6 | 46 | 53 |
| 20 | 8,7 | 43 | 53 |
| 30 | 15,2 | 51 | 62 |
| 50 | 28,5 | 57 | 71 |

c) Durchführung der Reaktionen im verdunkelten Raum ohne Erwärmung.

| | | | |
|----|------|----|-----|
| 10 | 7,4 | 74 | 86 |
| 20 | 11,4 | 57 | 70 |
| 30 | 18,6 | 62 | 76 |
| 50 | 43,2 | 86 | 107 |

Der zweite, wohl wesentlichste Punkt betrifft die leichte Zersetzlichkeit des 2,4-Dinitrophenylhydrazons in saurem Milieu. Bei dem obengenannten Verfahren wird das Hydrazon aus dem Carbonatextrakt in Essigester, nach Ansäuern bis auf pH 2, übergeführt. Wir haben in Kontrollansätzen mit synthetisch gewonnenem 2,4-Dinitrophenylhydrazon festgestellt, dass dieses bereits nach kurzem Stehen unter Zersetzung 2,4-Dinitrophenylhydrazin abspaltet, so dass die Ausbeute abnimmt. Auf dem Chromatogramm erkennt man diese Spaltung leicht an der zunehmenden Intensität des Fleckes mit Rf 0,9. Je länger das Hydrazon in stark saurem Milieu stehengelassen wird, desto grösser ist der

¹ S. MARKEES und F. GEY, *Helv. physiol. Acta* 11, 49 (1953). - S. MARKEES, *Biochem. J.* 56, 703 (1954).

² H. B. STEWART, *Biochem. J.* 55, XXVI (1953).

³ F. A. ISHERWOOD und D. H. CRUICKSHANK, *Nature* 173, 121 (1954).

Verlust. Je höher die Ausgangskonzentration an Hydrazon, desto mehr macht sich die Zersetzung bemerkbar (Tabelle II).

Tabelle II. Zersetzung des 2,4-Dinitrophenylhydrazons der BTS unter verschiedenen Säurezusätzen und bei wechselnden Reaktionszeiten.

a) BTS-2,4-Dinitrophenylhydrazon in Carbonat gelöst und mit konzentrierter HCl auf etwa pH 1 gebracht.

| Hydrazon γ | Extinktion | Gefunden, Hydrazon γ | Ausbeute % | Reaktionszeit |
|---------------|------------|----------------------------|---------------|------------------------------------|
| 20 | 0,205 | 17,7 | 89 | Sofortige Bestimmung 60' |
| 60 | 0,614 | 53,2 | 89 | |
| 20 | 0,168 | 14,5 | 73 | |
| 60 | 0,357 | 30,8 | 51 | |

b) BTS-2,4-Dinitrophenylhydrazon in wenig Carbonat gelöst und mit Trichloressigsäure aufgefüllt.

| | | | | |
|-----|-------|------|----|----|
| 20 | 0,137 | 11,7 | 58 | 5' |
| 40 | 0,323 | 27,8 | 69 | |
| 60 | 0,497 | 43,0 | 72 | |
| 100 | 0,847 | 73,6 | 73 | |

c) BTS-2,4-Dinitrophenylhydrazon in wenig Carbonat gelöst und mit Wasser aufgefüllt. Entsprechend der Enteiweissung von biologischem Material Wasser, Na-Wolframat und $\frac{2}{3}$ n H₂SO₄ zugesetzt.

| | | | | |
|-----|-------|------|----|-----|
| 20 | 0,080 | 6,8 | 34 | 30' |
| 40 | 0,198 | 17,0 | 42 | |
| 60 | 0,349 | 30,0 | 50 | |
| 100 | 0,639 | 55,2 | 55 | |

Zur Ausschaltung der genannten Fehlermöglichkeiten war eine prinzipielle Umänderung der Methode unumgänglich notwendig. Wir sind schliesslich so zum Ziele gelangt, dass wir jeden Säurezusatz vermieden haben. Dies gelingt dadurch, dass, wie bei der direkten Kolorimetrie, das 2,4-Dinitrophenylhydrazon mit Toluol ausgeschüttelt wird. Da aber der bei der direkten Kolorimetrie verwendete grosse Überschuss von 2,4-Dinitrophenylhydrazin sich bei der Chromatographie störend auswirkt, indem sich die Flecke dann nicht mehr gut trennen, muss die Menge des Reagens auf die Hälfte herabgesetzt werden. Der Toluolextrakt wird nach Waschen mit Wasser und Filtrieren im Vakuum eingedampft, der Rückstand in Essigester gelöst und diese Lösung direkt zur Chromatographie aufgetropft.

Die Verwendung von Toluol als erstes Extraktionsmittel des Reaktionsgemisches Blutfiltrat-2,4-Dinitrophenylhydrazin bringt noch einen weiteren Vorteil mit sich. Wir haben nämlich feststellen können, dass bei Extraktion mit Essigester und anschliessender Eluierung mit Carbonat ein nicht unbeträchtlicher Teil des 2,4-Dinitrophenylhydrazons der BTS im Essigester gelöst bleibt, das heisst also nicht in die Carbonatphase übergeht und damit für den weiteren Nachweis ausfällt. Dies ist bei Verwendung von Toluol nicht der Fall. Zur kolorimetrischen Nachweisbarkeit des Fleckens B als gefärbtes Hydrazon ist noch folgendes festzuhalten: Besprüht man das Chromatogramm mit NaOH-Lösung, dann färbt sich der Fleck A intensiv braunrot, während der

Fleck B keine erkennbare Rotfärbung annimmt. Eluiert man aus einem Chromatogramm von synthetisch hergestelltem BTS-2,4-Dinitrophenylhydrazon, das in abgestuften Mengen aufgetropft wird, den Fleck B getrennt vom Fleck A, dann findet sich ein immer ungefähr gleich bleibendes Verhältnis von B:A im Werte von 1:4. Führt man den gleichen Versuch mit Blut durch, dem bekannte Mengen Pyruvat vor der Umsetzung mit dem 2,4-Dinitrophenylhydrazin zugegeben werden, dann ergibt sich im Chromatogramm eine Verteilung von B:A wie etwa 1:9. Da, wie oben erwähnt, der B-Fleck auf dem Papier keine Rotfärbung bei Alkalibenetzung zeigt, nach der Eluierung mit Carbonat aber wieder eine leichte Rotfärbung nach NaOH-Zusatz erkennbar wird, muss angenommen werden, dass sich das dem Fleck B entsprechende Isomere zum mindesten teilweise wieder in das Isomere A umwandelt. Eine ähnliche Beobachtung haben wir schon früher bei dem Versuch angestellt, die Substanz B auf dem Wege über die papierchromatographische Trennung zu isolieren und chemisch zu charakterisieren – ein Versuch, der wegen der Unbeständigkeit von B nicht zum Erfolg geführt hat¹.

Wird unter Berücksichtigung der bisher aufgeführten Verlustquellen für das 2,4-Dinitrophenylhydrazon der BTS – Temperatur, Licht, Azidität, Lösungsmittel – eine BTS-Lösung bekannter Konzentration chromatographiert und anschliessend kolorimetriert, so erfasst man etwa 80% der Ausgangsmenge. Über die Ursachen des immer noch verbleibenden Verlustes lassen sich bisher keine quantitativ genauen Angaben machen. In der Hauptsache dürften die erwähnte Isomerisierung und der weitgehende Ausfall des Nachweises der Substanz B eine Erklärung abgeben; weiterhin macht sich die mit der ganzen Prozedur der Chromatographie zusammenhängende methodische Fehlerbreite störend bemerkbar. Praktisch hat der Nachweis dieses rund 20% betragenden Verlustes die Konsequenz, dass wir bei der Bestimmung der BTS im Blut mittels quantitativer Chromatographie regelmässig bekannte Mengen von BTS bzw. Natriumpyruvat dem Blut zusetzen müssen, um die exakte Ausbeute zu ermitteln. Da die Standardkurve für BTS in unserem Bereich streng linear verläuft, muss der für die Zusatzmenge gefundene Verlustbetrag proportional auch für die im Blute vorhandene BTS gelten und in Rechnung gestellt werden. Als Standard wird eine Kurve benutzt, deren Werte nach Zusatz von BTS in ansteigenden Mengen zu Blut gewonnen sind.

Unser Ziel war, wie eingangs erwähnt, die Kontrolle der mit der direkten Kolorimetrie bestimmten BTS-Werte des Blutes auf quantitative Genauigkeit. Wir wollten mit anderen Worten wissen, ob tatsächlich bei der direkten Kolorimetrie durch die «unspezifische» Dinitrophenylhydrazin-Methode nennenswerte Mengen von anderen Ketosäuren mit erfasst werden, die nicht der BTS entsprechen. Wir haben nach Abschluss der oben beschriebenen Überarbeitung des quantitativen chromatographischen Verfahrens und Eliminierung der Fehlerquelle noch einige Blutwerte vergleichend direkt-kolorimetrisch und quantitativ chromatographisch bestimmt. Dabei haben wir die in Tabelle III zusammengestellten Werte erhalten. Hiernach zeigen die mit der direkten Kolorimetrie bestimmten Blutwerte für die BTS eine zufriedenstellende Übereinstimmung mit den auf quantitativ-chromatographischem Wege gewonnenen Werten. Voraussetzung für diese Übereinstimmung ist die Berücksichtigung der Ausbeute zugesetzter BTS-Mengen.

¹ S. MARKEES und F. GEY, *Helv. physiol. Acta* 11, 49 (1953).

Tabelle III. Vergleich der direkten Kolorimetrie mit der quantitativen Chromatographie des 2,4-Dinitrophenylhydrazons der BTS im Blut. – Zusatz von Natriumpyruvat ($34,1 \text{ } \gamma/\text{cm}^3$ Blut = $30 \text{ } \gamma$ reine Brenztraubensäure) zu Kaninchenvollblut:

Direkte kolorimetrische Methode

| Kaninchen Nr. | Extinktion | Extinktion abzüglich Blutwert | Gefunden BTS, γ/cm^3 im Blut* | Zusatz- ausbeute % | Vergleich der papierchromatographischen mit der direkten Methode |
|---------------|------------|-------------------------------|---|--------------------|--|
| 1 | 0,228 | | 15,0 | — | — |
| 1 + 30 | 0,679 | 0,451 | | | |
| 2 | 0,402 | | 26,6 | — | — |
| 2 + 30 | 0,860 | 0,458 | | | |
| 3 | 0,184 | | 12,8 | — | — |
| 3 + 30 | 0,615 | 0,431 | | | |
| 4 | 0,192 | | 13,2 | — | — |
| 4 + 30 | 0,629 | 0,437 | | | |
| 5 | 0,648 | | 46,4 | — | — |
| 5 + 30 | 1,070 | 0,422 | | | |
| 6 | 0,456 | | 28,4 | — | — |
| 6 + 30 | 0,940 | 0,484 | | | |
| 7 | 0,438 | | 28,4 | — | — |
| 7 + 30 | 0,903 | 0,465 | | | |

Papierchromatographische Methode

| | | | | | |
|--------|-------|-------|------|----|-----|
| 1 | 0,160 | | 10,5 | | |
| 1 + 30 | 0,483 | 0,323 | 21,4 | 71 | 99 |
| 2 | 0,272 | | 18,0 | | |
| 2 + 30 | 0,586 | 0,314 | 21,6 | 72 | 94 |
| 3 | 0,108 | | 12,2 | | |
| 3 + 30 | 0,382 | 0,274 | 25,4 | 85 | 96 |
| 4 | 0,104 | | 12,0 | | |
| 4 + 30 | 0,374 | 0,270 | 24,5 | 82 | 91 |
| 5 | 0,441 | | 47,6 | | |
| 5 + 30 | 0,721 | 0,280 | 28,0 | 93 | 101 |
| 6 | 0,307 | | 29,8 | | |
| 6 + 30 | 0,615 | 0,308 | 24,0 | 80 | 105 |
| 7 | 0,287 | | 29,6 | | |
| 7 + 30 | 0,596 | 0,309 | 26,6 | 89 | 104 |

* Die Ungleichheit der in dieser Rubrik aufgeführten Extinktionswerte für die gleichbleibenden Zusatzmengen ist der Ausdruck der von Blut zu Blut etwas schwankenden Ausbeute von zugesetzter BTS. Da aber die Kurve der Extinktionswerte von BTS-Zusätzen in aufsteigenden Konzentrationen zum einzelnen Blut stets linear verläuft, ist die Bestimmung nur eines Wertes für die Festlegung ihrer Richtung ausreichend und zulässig. Die in der Nebenrubrik angegebenen Werte für die BTS im Blut sind jeweils auf einer derart angefertigten Kurve, die die Ausbeute berücksichtigt, abgelesen.

Wir dürfen als Endergebnis dieser langwierigen Nachprüfungen festhalten, dass, wie wir schon früher behauptet hatten, für Routine-Untersuchungen die rasch arbeitende direkte kolorimetrische Methode der BTS-Bestimmung mittels des 2,4-Dinitrophenylhydrazins ausreichend genau ist. Die Miterfassung anderer Ketsäuren spielt quantitativ keine wesentliche Rolle. Für sehr genaues Arbeiten, das die Ermittlung von Absolutwerten für die BTS erfordert, empfiehlt es sich, auch bei der direkten Kolorimetrie Zusätze von bekannten BTS-

Mengen vorzunehmen, um die jeweils etwas schwankende Ausbeute kontrollieren und in Rechnung stellen zu können. – Im folgenden sei noch unser technisches Vorgehen beschrieben, das wir für die quantitative Papierchromatographie des 2,4-Dinitrophenylhydrazons der BTS entwickelt haben.

Methode. 4 cm^3 ungeronnenes Vollblut mit Zusatz von Liquemin werden mit 20 cm^3 einer 10%igen Trichloressigsäurelösung enteiuweissst und zentrifugiert. Das klare Zentrifugat wird 5 min in kochendes Wasser gestellt und wieder auf Zimmertemperatur abgekühlt. 15 cm^3 des Zentrifugates werden mit $2,5 \text{ cm}^3$ einer 0,2%igen 2,4-Dinitrophenylhydrazinlösung versetzt und 5 min zum Reagieren stehengelassen. Extraktion des Reaktionsgemisches mit 15 cm^3 reinstem Toluol während 1 min unter Schütteln. Verwerfen der wässrigen Phase. Der Toluolextrakt wird mit wenig Wasser gewaschen, und die Wasserspuren werden durch Filtration entfernt. Eindampfen von 12 cm^3 des Toluolextraktes im Vakuum bei rund 30° zur Trockne. Aufnehmen des Rückstandes in 4 cm^3 Essigester, wovon 1 cm^3 ($= 0,5 \text{ cm}^3$ Blut) mit Sicherheitspipette auf das Papier (Whatman Nr. 1) aufgetropft wird. Aufsteigende Chromatographie in mit 3%igem Ammoniak gesättigtem Butanol während 14 h. Trocknen des Papiers bei Zimmertemperatur, Abgrenzung der Flecken A und B in Form von für den Einzelversuch gleichbleibend grossen Rechtecken von etwa $3 \times 4 \text{ cm}$, Ausschneiden und feines Zerschneiden. Gemeinsame Eluierung von A und B mit 8 cm^3 einer 10%igen Natriumcarbonatlösung unter zweistündigem Schütteln bei Zimmertemperatur im verdunkelten Raum. Abnutschen und Zusatz von $1,5 \text{ cm}^3$ einer 2n-NaOH-Lösung zu 6 cm^3 des Carbonatextraktes, Kolorimetrie nach etwa 2 min. Photometer: Lumetron, Filter 490. Schichtdicke 2 cm. Auswertung der gefundenen Extinktionen nach einer Standardkurve, die nach Zusatz bekannter Mengen von Natriumpyruvat zu Blut gewonnen wurde. Um Gamma pro Kubikzentimeter zu erhalten, muss mit $\frac{8}{3}$ multipliziert werden.

Herrn Dr. KOFLER habe ich für die Beratung bei allen methodischen Fragen zu danken, Frl. R. BRITT für die geschickte Hilfe bei der Durchführung der Untersuchungen.

Summary

The accuracy of direct colorimetric estimation of pyruvic acid in the blood has been controlled by the quantitative chromatographic method. To do this it was indispensable to elaborate a new procedure for the quantitative chromatography, since without certain precautions there arose considerable losses owing to the sensitivity of the 2,4-dinitrophenylhydrazone of pyruvic acid to light, temperature, solvents or acids. Avoiding these possibilities of error there still remained a difference of about 20% between the two procedures which could be explained as the result of the formation of two isomers of 2,4-dinitrophenylhydrazone in addition to a smaller purely technical loss. This difference could be corrected by estimating the yield of known quantities of added pyruvate, and as a final result satisfactory agreement between the two methods has been achieved. The direct colorimetric estimation of pyruvic acid as 2,4-dinitrophenylhydrazone is sufficiently specific; it includes no appreciable quantities of other keto-acids and furnishes reliable values.