

## SUMMARY

Hydroxy nitriles when treated with polyphosphoric acid yield the corresponding carbamido-alkyl phosphoric acids; but when treated with  $\text{POCl}_3$  in the presence of a tertiary base they yield the corresponding cyano-alkyl phosphoric acids.  $\beta$ -cyanoethyl phosphoric acid is very easily dephosphorylated in  $1N$   $\text{NaOH}$ .  $\beta$ -X-alkylphosphoric esters are dephosphorylated in alkaline medium when  $-X$  is  $-\text{C}\equiv\text{N}$ ,  $-\text{C}\begin{smallmatrix} \text{O} \\ \parallel \end{smallmatrix}\text{NH}_2-$ ,  $-\text{COOH}$ ,  $\equiv\text{CH}$  or  $-\text{SO}_3\text{H}$ .

Laboratoires de chimie organique et pharmaceutique  
de l'Université de Genève

## 113. Macro- et microdosage de traces de cobalt

VI<sup>1)</sup>. Dosage du cobalt dans le sang

par W. Haerdi, J. Vogel, D. Monnier et P. E. Wenger

(3 III 60)

**Introduction.** Le dosage de traces de cobalt dans le sang a pris un intérêt particulier depuis que certains auteurs, notamment SMITH<sup>2)</sup>, ont montré que cet élément jouait un rôle important, sous forme ionique comme à l'état complexé dans la vitamine  $\text{B}_{12}$ , en tant que facteur antianémique. D'autre part, divers auteurs<sup>3)</sup> ont déterminé la teneur en cobalt du sang dans le cas d'infections hépatiques. Ils affirment avoir trouvé jusqu'à  $12,26 \mu\text{g}$  de cobalt pour 100 ml de sang. On peut donc supposer que dans certains cas pathologiques, la vitamine  $\text{B}_{12}$  stockée dans le foie, se décompose et que le cobalt ionique formé passe dans le sang.

Le premier article important relatif au dosage du cobalt dans le sérum de sang de vache est dû à POHL & DEMMEL<sup>4)</sup>. Ils minéralisent 10 ml de sérum au moyen d'acide perchlorique et d'un mélange sulfo-nitrique. Le cuivre est extrait par la dithizone, le fer, au moyen de l'oxine, et le cobalt, avec le diéthyl-dithiocarbamate de sodium. Ce dernier complexe est détruit, et le cobalt, dosé spectrophotométriquement avec le nitroso-sel R (le volume de la solution finale est de 1 ml, et la contamination au cours des opérations, de  $0,01 \mu\text{g}$ ).

THIERS, WILLIAMS & YOE<sup>5)</sup> ont déterminé le cobalt dans le sang humain complet. Un échantillon de 50 à 100 ml est minéralisé par calcination à  $450^\circ$  et le résidu est repris par  $\text{HCl } 9M$ . Le fer est extrait par l'éther isopropylique chlorhydrique et les dernières traces sont éliminées au moyen de la résine Dowex 1-X8 qui retient le cobalt, le cuivre, le zinc et le fer. Le cobalt est élué par du  $\text{HCl } 4M$ , et on ajoute un peu de nickel qui servira d'étalon interne. Une goutte de la solution concentrée est spectrographiée sur électrode de carbone. Toutes les pertes subies au cours des opérations sont déterminées par marquage au cobalt 60.

RODIER<sup>6)</sup> dose le cobalt dans le sang pour dépister la cobaltémie des mineurs travaillant dans les mines d'arséniure de cobalt. L'auteur effectue une minéralisation par voie humide d'en-

<sup>1)</sup> I, II, III: voir Helv. 42, 1672, 1846, 2334 (1959); IV et V: *ibid.* 43, 217, 675 (1960).

<sup>2)</sup> E. L. SMITH, Nature 162, 144 (1948).

<sup>3)</sup> E. P. SUSHKO, Sbornik Nauch. Rabot Minsk. Med. Inst. 19, 269 (1957).

<sup>4)</sup> F. A. POHL & H. DEMMEL, Analyt. chim. Acta 10, 554 (1954).

<sup>5)</sup> R. E. THIERS, J. F. WILLIAMS & J. H. YOE, Analyt. Chemistry 27, 1725 (1955).

<sup>6)</sup> J. RODIER, Ann. Biol. clin. (Paris) 16, 489 (1958).

viron 10 ml de sang au moyen d'un mélange sulfo-nitro-perchlorique. Le fer est précipité au moyen de pyridine en milieu HCl. Après centrifugation et décantation, la solution est évaporée à sec en présence de  $\text{NO}_3\text{H}$ . On procède alors au dosage spectrophotométrique du cobalt au moyen du nitroso-sel R. La méthode décrite est encore sensible à 0,1  $\mu\text{g}$  de cobalt par ml. Le volume de la solution finale est de 10 ml. Cette méthode ne peut s'appliquer qu'à du sang renfermant des teneurs anormalement élevées de cobalt.

Récemment, SMOCZKIEWICZOWA & MIZGALSKI<sup>7)</sup> ont mis au point une méthode de séparation du cuivre et du cobalt par chromatographie sur papier, après minéralisation par voie sèche de 10 ml de sang complet. La partie du chromatogramme contenant les deux éléments est découpée, puis calcinée sur une feuille d'argent. Le dosage simultané des deux éléments est effectué par spectrographie.

Dans le tableau I, les résultats des différents dosages sont réunis.

Tableau I. *Taux de cobalt dans le sang trouvé par divers auteurs*

Ref.	Nature du sang	Volume ml	Co trouvé $\mu\text{g}/100$ ml	Limite d'erreur de la méthode	Minéralisation	Séparation	Dosage
4)	sérum de vache	10	0,59	$\pm 5\%$	humide	extract.	spectroph.
5)	sang humain normal	50-100	0,038-0,0083	$\pm 10\%$	sèche	résine	spectrogr. d'émission
6)	sang humain cobaltémique	10	50-26	?	humide	extract.	spectroph.
7)	sang humain normal	10	0,050-0,035	$\pm 7\%$	sèche	chromat.	spectrogr. d'émission

Ainsi que le montre le tableau I, la méthode spectrophotométrique n'a pas été utilisée pour le dosage du cobalt dans le sang humain normal, car elle n'avait pas été estimée suffisamment sensible. POHL & DEMMEL l'ont mise en œuvre pour le sérum de sang de vache, mais les quantités de Co qu'ils ont trouvées sont très élevées. Les valeurs sont peut-être valables pour un sang animal, mais ne correspondent pas à celles trouvées pour le sang humain par d'autres auteurs. En effet, les résultats obtenus pour le sang humain par THIERS et coll.<sup>5)</sup> ainsi que SMOCZKIEWICZOWA et coll.<sup>7)</sup> sont certainement les plus précis du fait qu'ils ont étudié avec le plus grand soin les méthodes de séparation afin d'éviter les contaminations; quant aux pertes, elles ont été déterminées avec exactitude. Leur méthode est par contre délicate et présente l'inconvénient d'exiger des spécialistes en spectrographie. Il était donc intéressant, puisque nous avons augmenté plus de 10 fois la sensibilité absolue du dosage spectrophotométrique<sup>8)</sup>, de l'appliquer au dosage du cobalt dans le sang.

*Appareils et matériel.* Echelle décadique «Tracerlab 1000 scaler» munie d'un photomultiplicateur avec un cristal creux SPG-3, ainsi que d'un compteur plongeur GEIGER-MÜLLER TGC-4. Résine échangeur d'ions Dowex 1-X8. Creusets et capsules en quartz de la SOCIÉTÉ ELECTROTHERMIQUE DE LA TOUR DE TRÊME. Spectrophotomètre BECKMAN modèle DU avec photomultiplicateur et support pour microcuves de 0,2 à 0,002 ml.

### I. Extraction du cobalt de cendres de sang synthétique par la dithizone.

Dans un travail précédent<sup>9)</sup>, nous avons montré qu'il est possible, partant d'une

<sup>7)</sup> A. SMOCZKIEWICZOWA & W. MITZGALSKI, *Nature* 182, 855 (1947).

<sup>8)</sup> W. HAERDI, J. VOGEL, D. MONNIER & P. E. WENGER, *Helv.* 42, 2334 (1959).

<sup>9)</sup> D. MONNIER, W. HAERDI, J. VOGEL & P. E. WENGER, *Helv.* 42, 1846 (1959).

solution aqueuse renfermant quelques nanogrammes de cobalt seulement, d'en extraire au moyen de la dithizone la totalité en quatre opérations. WILLIAMS et coll.<sup>10)</sup> par contre n'ont pu extraire, de solutions aqueuses synthétiques de cendres de sang, marquées au cobalt 60, que le 30% du cobalt actif. Afin de vérifier les constatations de ces auteurs, nous avons refait une série d'essais en nous mettant autant que possible dans les mêmes conditions qu'eux.

Nous avons préparé une *solution synthétique de cendres de sang*. La composition de cette solution de départ (mg de sel dissous dans 500 ml d'eau bidistillée) est donnée dans la colonne 2 du tableau II. Dans la colonne 1 du même tableau, nous avons inscrit les principaux constituants minéraux du sang (mg/100 ml), valeurs données par les Tables Scientifiques GEIGY<sup>11)</sup>. Nous constatons que les 500 ml de la solution de départ préparée renferment les éléments minéraux contenus dans approximativement 5 litres de sang normal. Pour avoir par exemple la quantité d'éléments minéraux contenus dans les cendres de 250 ml de sang, il nous suffira de prélever 25 ml de cette solution de départ.

Tableau II. *Composition minérale d'un sang normal et de la solution de cendres de sang synthétique de départ que nous avons préparée*

Eléments ou composés	Dans le sang en mg/100 ml	Sels composant la solution de départ	Dans 500 ml d'eau en g
Cl	300	NaCl	26
Na	195		
K	175,2	KCl	17
Fe	50	FeCl <sub>3</sub> , 6 H <sub>2</sub> O	12
P	38	PO <sub>4</sub> HNa, 12 H <sub>2</sub> O	22
SiO <sub>2</sub>	8,3	SiO <sub>3</sub> Na <sub>2</sub>	0,8
Ca	6	CaCO <sub>3</sub>	0,7
Mg	1,93	MgCO <sub>3</sub>	0,35
Zn	0,88	ZnSO <sub>4</sub> , 7 H <sub>2</sub> O	0,2
S	0,45	SO <sub>4</sub> K <sub>2</sub>	1,2
Cu	0,094	CuCl <sub>2</sub> , 2 H <sub>2</sub> O	0,0012
Mn	0,015	MnCl <sub>2</sub> , 4 H <sub>2</sub> O	0,005
Al	0,015	AlCl <sub>3</sub> , 6 H <sub>2</sub> O	0,007

Cette solution de départ se présente sous la forme d'un liquide blanc-jaunâtre dont une partie des constituants se trouvent en suspension. Lorsqu'on veut effectuer un prélèvement, il est indispensable de secouer le flacon contenant le mélange afin d'obtenir une prise homogène.

*Purification.* Pour être certains que la solution synthétique ne renferme pratiquement plus de cobalt, nous l'avons purifiée. Cette opération doit se faire sans aucun changement de la composition initiale de la solution. Pour pouvoir suivre la séparation du cobalt, nous avons introduit une fraction de  $\gamma$  de cobalt marqué (<sup>60</sup>Co). Dans ce but, nous avons ajouté à 25 ml de la solution de départ (représentant donc les éléments ou composés contenus dans 250 ml de sang), 10 ml de HCl concentré ainsi que 2 ml d'une solution de <sup>60</sup>Co (800 000 cpm) titrant 0,07  $\mu$ g de Co total par ml et d'une activité de 0,5  $\mu$ c/ml (400 000 cpm). Après chauffage, on évapore à sec. Le résidu est repris par 40 ml de HCl 9 M. On laisse déposer les sels insolubles et décante la solution limpide. Les sels sont lavés avec du HCl 9 M. La solution de décantation et les solutions de lavage sont passées sur résine Dowex 1-X8 qui retient le cobalt quantitativement. La résine est lavée avec

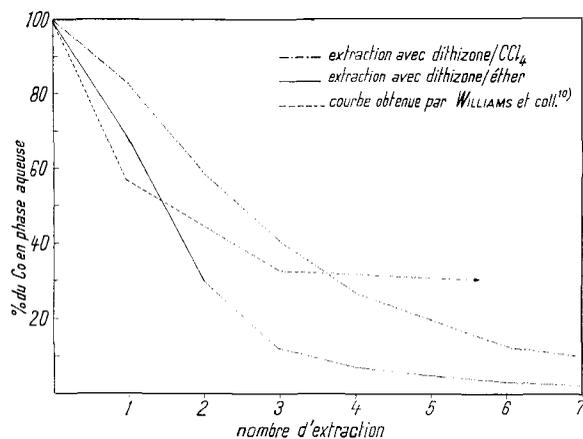
<sup>10)</sup> R. E. THIERS, dans Trace Analysis de YOE & KOCH, J. Wiley & Son, Inc., N. Y. 1957, p. 653.

<sup>11)</sup> Tables Scientifiques GEIGY, éd. 1955, p. 312.

20 ml de HCl 9M et le cobalt, élué avec 20 ml de HCl 4M. Le fer retenu et les éventuels autres éléments sont élués par passage de 20 ml de HCl 0,01M. Aux sels insolubles, nous ajoutons les solutions de passage, de lavage et d'élué du fer. Le tout est évaporé à sec, puis on ajoute 2 ml de HCl concentré ainsi que 40 ml de citrate de sodium 10%. Par addition de NaOH 10M, on amène la solution au pH 8 et complète le volume à 50 ml au moyen d'une solution de citrate 10%, pH 8. Dans ces conditions, le fer est complexé et la solution est tout à fait limpide. On détermine l'activité de la totalité de la solution (12000 cpm). Nous dosons le cobalt contenu dans l'éluat HCl 4M au moyen du nitroso-sel R et avons trouvé 1  $\mu\text{g}$  (788000 cpm). La quantité de cobalt restant dans les 50 ml de solution finale (représentant les éléments contenus dans 250 ml de sang) est donc de 0,015  $\mu\text{g}$  (12000 cpm). Si nous prélevons 10 ml de cette solution, qui contient les éléments en solution dans 50 ml de sang, seulement 0,0030  $\mu\text{g}$  de cobalt sont présents. Partant de ces 10 ml, nous leur ajoutons 0,25 ml d'une solution renfermant 0,0035  $\mu\text{g}$  de cobalt total et présentant une activité de  $2,5 \cdot 10^{-2}$   $\mu\text{c}$ . Nous avons donc finalement 0,0065  $\mu\text{g}$  de cobalt à séparer par extraction au moyen de dithizone, en présence des éléments contenus dans les cendres synthétique de 50 ml de sang.

*Séparation.* Conditions: Volume de la solution aqueuse: 10,25 ml; concentration en citrate, 10%; pH 8. 0,0065  $\mu\text{g}$  de cobalt à séparer. Phase organique: dithizone/ $\text{CCl}_4$  et dithizone/éther. Temps d'agitation au cours de chaque extraction: 1 min. Les résultats sont représentés sur le graphique.

Ainsi, dans nos conditions de travail, il est possible d'extraire quantitativement quelques nanogrammes de cobalt aussi bien dans les solutions pures que dans celles de sang synthétique. Nous ne retrouvons pas les courbes d'extraction de WILLIAMS et coll., de plus nous constatons, comme nous l'avons fait dans un travail précédent<sup>9)</sup>, que l'extraction à l'éther est beaucoup plus rapide que celle au tétrachlorure, l'équilibre de phase dans le premier cas s'établissant presque immédiatement.



Extraction du cobalt à la dithizone

Si, après évaporation du solvant organique et destruction de la dithizone et du dithizonate de cobalt par un traitement acide, nous dosons spectrophotométriquement au moyen du nitroso-sel R les quelques nanogrammes de cobalt, nous obtenons des résultats peu reproductibles. Si l'extraction au moyen de la dithizone est quantitative, même pour quelques nanogrammes de cobalt, elle n'est pas assez sélective car, comme nous avons pu le constater, les substances étrangères extraites en même temps que le cobalt gênent la détermination de traces de cet élément. C'est pourquoi

nous avons eu recours à un autre processus de séparation, celui utilisant la résine Dowex 1-X8 qui nous avait donné des résultats satisfaisants, notamment dans le dosage de cobalt dans les aciers.

**II. Séparation du cobalt sur résine Dowex 1-X8.** – *Etude de la destruction de la résine.* Pour ce qui concerne le sang, les quantités de cobalt sont telles (0,05 à 0,01  $\mu\text{g/ml}$  au moment de la colorimétrie), que les traces de résine qui entrent en solution ou en suspension, perturbent la détermination spectrophotométrique. Nous avons donc cherché à les détruire, et pour cela nous avons préparé les solutions suivantes: a) une suspension de 0,1 g de résine dans 5 ml de HCl 4M et 1 ml de NaCl 5% comme support; b) une suspension de même composition que la précédente plus 0,19  $\mu\text{g}$  de cobalt; c) une solution composée de 1 ml de NaCl 5% et 5 ml de HCl 4M et enfin d) une solution de même composition que c) avec, en plus, 0,19  $\mu\text{g}$  de cobalt. Ces quatre liqueurs sont évaporées à sec (calotte à rayonnement IR.). On ajoute 1 ml de  $\text{NO}_3\text{H}$  conc. et 3 ml de HCl conc., couvre d'un verre de montre puis pose le tout sur une plaque chauffante. On évapore encore une fois à sec, ajoute 3 ml de  $\text{HClO}_4$ , chauffe à reflux pendant une à deux heures jusqu'à décoloration totale, évapore à sec, puis ajoute 1 ml de HCl et évapore une dernière fois à sec. On reprend par 2 ml d'eau bidistillée et effectue le dosage colorimétrique. Les résultats sont donnés dans le tableau III. Volume au moment de la mesure: 5 ml.

Tableau III. *Transmissions enregistrées après destruction de 0,1 g de résine Dowex 1-X8, avec et sans adjonction de cobalt*

Solution a) % T	Solution b) % T	Solution c) % T	Solution d) % T
99,3	77,5	99,1	77,1
98,9	77,1	99,4	76,8
98,9	76,9	98,9	76,9

Tableau IV. *Détermination des fractions de l'éluat contenant le cobalt après passage sur résine Dowex 1-X8*

(colonne de 12 cm de haut et 0,6 cm de diamètre, poids de la résine environ 2 g, 100–200 mesh)

Essai No.	cpm ajoutés	cpm retrouvés dans les diverses fractions*)							Total extrait cpm
		1 <sup>re</sup> 4 ml	2 <sup>e</sup> 4 ml	3 <sup>e</sup> 4 ml	4 <sup>e</sup> 4 ml	5 <sup>e</sup> 4 ml	6 <sup>e</sup> 4 ml	7 <sup>e</sup> 4 ml	
1	32471	—	30609	1397	164	—	—	—	32170
2	31209	—	29891	1134	62	18	—	—	31105
1	% extrait	—	92,2	4,3	0,5	—	—	—	99,0
2	% extrait	—	95,8	3,6	0,2	0,1	—	—	99,7

\*) Le signe (—) indique que les cpm sont de l'ordre de grandeur de ceux provenant du bruit de fond.

Nous constatons donc qu'une quantité de résine de 0,02 g/ml, si nous lui faisons subir le traitement décrit ci-dessus, ne gêne pas le dosage de 0,04  $\mu\text{g/ml}$  de cobalt.

*Etude de l'élution du cobalt.* Bien qu'il soit possible de détruire la résine, l'opération n'est pas particulièrement rapide lorsque cette dernière est présente en grande quantité. Il faut donc que la solution à «colorimétrer» en renferme le moins possible. Dans ce but, il est nécessaire de savoir dans quelles fractions de l'éluat se trouve le cobalt.

Cette élution se fait au moyen de 32 ml de HCl 4M. Le cobalt ayant été préalablement marqué, nous avons recueilli l'éluat après passage sur résine, par fractions de 4 ml et effectué le comptage de chacune d'elles au compteur à puits «Tracerlab» (voir tabl. IV).

Nous constatons que la majeure partie du cobalt 60 ajouté, se trouve dans la deuxième fraction de 4 ml. En réunissant la deuxième et la troisième fraction de 4 ml (soit 8 ml au total), nous récupérons pour ainsi dire quantitativement le cobalt (98,5%). Les autres fractions renfermant de la résine et pratiquement pas de cobalt, ne sont pas conservées.

**III. Séparation et dosage du cobalt dans le sang, mode opératoire.** – Abandonnant les solutions synthétiques, nous poursuivons maintenant nos essais sur du sang complet, afin de déterminer les conditions les meilleures pour le dosage du cobalt. La minéralisation dans des creusets de 5 cm de hauteur et 5 cm de diamètre supérieur et d'un volume total de 40 ml provoque des pertes en cobalt de 17% environ. D'autre part, la séparation du fer, après minéralisation, par l'éther chlorhydrique élève ces pertes à 30%. Enfin, après toutes les opérations de séparation et de préparation à la mesure colorimétrique, il n'est plus resté que les 54% du cobalt initial. Bien que ces pertes puissent être assez exactement évaluées par un indicateur radioactif (cobalt 60), nous avons cherché à les réduire autant que possible, d'une part en évaporant le sang dans une capsule, ce qui permet de réduire le temps de l'opération et d'éviter les pertes dues au boursoufflement du sang, d'autre part en augmentant les dimensions de la colonne contenant l'échangeur d'ions, pour éviter l'extraction du fer à l'éther chlorhydrique et les pertes qui en résultent. Finalement, nous avons mis au point une méthode dont les pertes sont comprises entre 10 et 30%, pertes dont on tient compte avec précision au moment de l'interprétation des résultats, grâce à un marquage au cobalt 60.

*Minéralisation.* A 50–100 g de sang complet (exempt d'anticoagulant) directement recueillis dans des erlenmeyers de 200 ml, on ajoute 4 ml d'une solution de  $^{60}\text{Co}$  représentant 0,003  $\mu\text{g}$  de cobalt total et présentant une activité de 0,017  $\mu\text{C}$ . Cet indicateur radioactif nous permettra d'évaluer les pertes en fin d'analyse. Après avoir soigneusement homogénéisé par brassage énergétique, on introduit le sang par portions de 20 ml dans une capsule de quartz de 2 cm de hauteur, 7 cm de diamètre et d'un volume total de 40 ml, placée sous une calotte à infra-rouge, en ayant soin de prendre toute précaution afin d'éviter une contamination éventuelle par des poussières. La température est maintenue entre 160 et 180°. Une nouvelle addition de sang ne se fait que lorsque la précédente est entièrement transformée en une masse noire carbonisée. Lorsque le sang a été ainsi évaporé (il faut environ 5 h), on minéralise le résidu en introduisant la capsule dans un four porté progressivement à la température de 450 à 500°. Après 12 h, la minéralisation est achevée; on obtient un résidu brun clair.

*Séparation du cobalt.* Si on examine le tableau II, on constate que le fer est l'élément gênant principal pour la détermination spectrophotométrique du cobalt avec le nitroso-sel R. Nous ne faisons pas l'extraction à l'éther chlorhydrique pour les raisons données ci-dessus; en effet le passage sur résine est suffisant si celle-ci n'est saturée en ions  $\text{Fe}^{+++}$  que dans sa partie supérieure. Les dimensions de la colonne étant judicieusement établies, cette condition est remplie.

*Préparation de la colonne.* – Elle doit avoir une hauteur active de 15 cm et un diamètre de 0,8 cm. Elle renferme environ 3 g de résine Dowex 1-X8, 100 à 200 mesh. A 10 g de résine, on ajoute 100 ml d'eau bidistillée et brasse la suspension. On laisse reposer et décante la liqueur contenant les fractions les plus fines et les plus légères qui sont ainsi éliminées. On répète cette opération 5 fois, puis on termine en ajoutant 100 ml de  $\text{HCl}$  0,01 M. On introduit alors une partie de la résine dans la colonne. Dans le fond de celle-ci, on dépose un tampon de laine de verre, un même tampon sera placé sur la résine après remplissage. La colonne est lavée au moyen de 20 ml de  $\text{HCl}$  0,01 M pour éliminer toutes traces d'éléments minéraux, puis elle est saturée par 10 ml de  $\text{HCl}$  9 M.

*Préparation de la solution de sang minéralisé.* Le résidu de minéralisation contenu dans la capsule de quartz est introduit dans un becher PHILIPS de 50 ml. La capsule est rincée 4 fois au moyen de portions de 10 ml de HCl 9M, que l'on transvase dans le becher. Celui-ci est alors chauffé 5 à 10 min à 70–80°. La solution devient limpide et jaune, les sels et les oxydes se dissolvent. Par refroidissement il se forme un léger précipité blanc de sels insolubles à froid dans HCl 9M.

*Séparation du cobalt proprement dite.* On introduit la solution précédente dans la colonne, en évitant l'entraînement du précipité qui doit rester au fond du becher. Le précipité est lavé au moyen de 5 ml de HCl 9M pour en extraire les dernières traces de cobalt. Cette solution de lavage est également passée dans la colonne. Le liquide doit s'écouler à raison de 1 goutte en 6–8 sec. Il se dépose parfois dans la laine de verre, placée au-dessus de la résine, un peu de cendre noire qui ne gêne pas la séparation. On lave alors la colonne avec 10 ml de HCl 9M pour entraîner les éléments qui n'y sont pas retenus (Na, K, Ca par exemple). On effectue l'éluion du cobalt en introduisant dans la colonne, 30 ml de HCl 4M. Ces 30 ml sont récupérés par portions de 4 ml dans des éprouvettes graduées de 6 cm de hauteur et 1 cm de diamètre (éprouvettes utilisées pour la détermination de l'activité au moyen du cristal creux Tracerlab SPG-3). Nous mesurons l'activité de ces diverses fractions afin de savoir comment le cobalt se répartit entre elles (voir tabl. V). Il a été fait trois essais identiques désignés sous les chiffres 1, 2 et 3 avec un même sang et deux essais 4 et 5 faits avec tous les réactifs utilisés après la minéralisation.

Tableau V. Détermination de l'activité des diverses fractions

Analyse No.	cpm ajoutés (4 ml)	cpm 1 <sup>re</sup> fraction 4 ml	cpm 2 <sup>e</sup> fraction 4 ml	cpm 3 <sup>e</sup> fraction 4 ml	cpm 4 <sup>e</sup> fraction 4 ml	cpm 5 <sup>e</sup> fraction 4 ml
1	11 514	—	5548	4274	788	161
2	11 516	—	7657	2868	355	128
3	11 488	pas d'activité	6883	2578	533	168
4	11 608	—	9875	2167	148	31
5	11 450	—	9639	1612	97	42

Comme nous l'avions constaté dans les essais préliminaires, la majeure partie du cobalt se trouve dans les 2<sup>e</sup> et 3<sup>e</sup> fractions, soit pour les analyses 1, 2 et 3 respectivement 85,3%, 91,3% et 89,3%. Pour les analyses 4 et 5, nous trouvons respectivement 104% et 99,5%. La présence de fer retarde un peu la migration du cobalt, de sorte que les proportions contenues dans les fractions 3 et 4 des analyses 1, 2 et 3 sont un peu supérieures à celles trouvées dans des essais préliminaires effectués sur des solutions de cobalt pur (voir tabl. IV) et les analyses 4 et 5 ne contenant pas de fer. La durée de la séparation est de 4 h environ.

*Destruction des traces de résine.* Afin de détruire la résine qui aurait pu passer dans la solution nous introduisons la 2<sup>e</sup> et la 3<sup>e</sup> fraction contenant la majeure partie du cobalt, dans une capsule de quartz de 1,5 cm de hauteur, de 3,5 cm de diamètre et d'un volume de 4–5 ml, en présence de 0,1 ml de NaCl 5% comme support. Après évaporation sous une calotte IR. et refroidissement, nous introduisons 0,5 ml de NO<sub>3</sub>H conc. et 1,5 ml de HCl conc., puis recouvrons la capsule d'un verre de montre avant de la poser sur une plaque chauffante (température 120–140°). Il se produit une lente évaporation. Lorsque le résidu est sec, on y ajoute à froid 1 ml d'acide perchlorique et continue l'attaque au reflux pendant 30–40 min environ. On place alors la capsule sous une calotte IR. en enlevant le verre de montre, et évapore à sec. Finalement, on rince le verre de montre avec 1 ml de HCl conc. qu'on recueille dans la capsule. Après une nouvelle évaporation à sec, le résidu est parfaitement blanc et prêt pour la colorimétrie.

*Détermination des pertes.* Le résidu est repris par 0,4 ml d'eau bidistillée et transvasé dans un tube à centrifuger de 3 à 4 ml (celui qui a été utilisé au début de l'analyse pour la détermination de l'activité). On lave la capsule avec 0,4 ml au total d'une solution tampon d'acétate de sodium à 10%, on verse ces solutions dans le tube et mesure l'activité au compteur à puits

«Tracerlab». Après avoir fait les corrections qui s'imposent par le fait que le volume actuel (0,8 ml) est différent du volume initial (4 ml), on calcule les pertes effectuées au cours des diverses opérations.

Tableau VI. *Compte-rendu des pertes*

Analyse No.	cpm au départ (0,8 ml)	cpm retrouvé (0,8 ml)	Pertes %
1	16449	13366	18,7
2	16446	12441	24,4
3	16411	11880	27,4
4	16583	14666	11,6
5	16103	14350	12,7

Les analyses 4 et 5, ne contenant que les réactifs, ont passé par tous les stades de séparation sauf la minéralisation.

Nous constatons pour les analyses 1, 2 et 3 (correspondant aux diverses prises de sang) que les pertes lors des opérations de minéralisation et de séparation sur résine sont de l'ordre de 12% (v. tabl. V). Comme les pertes totales au cours d'une analyse sont en moyenne de 24% (v. tabl. VI), nous pouvons conclure que les pertes lors de la destruction de la résine et préparation pour le dosage spectrophotométrique s'élèvent à 12% environ. Nous signalerons toutefois qu'aucune précaution spéciale n'a été prise pour les éviter, puisqu'elles n'entachent pas les résultats. De plus, les fractions 4 et 5 (obtenues lors de la séparation sur colonne), ne renfermant que de très faibles quantités de cobalt (v. tabl. IV), n'ont pas été prises en considération.

*Dosage spectrophotométrique du cobalt.* Ce dosage a été discuté en détail dans un article précédent<sup>8)</sup>.

Nous introduisons dans le tube à centrifuger contenant le cobalt à doser, 0,1 ml d'une solution de nitroso-sel R à 0,05% fraîchement préparée et chauffons 1 min au bain-marie bouillant. On introduit alors 0,1 ml de  $\text{NO}_3\text{H}$  conc. pour détruire une partie de l'excès de réactif et les éventuels complexes du fer ou autres métaux qui ont pu se former, et chauffe dans les mêmes conditions que précédemment encore 30 sec. Le tube est refroidi sous un courant d'eau, et on centrifuge 20 min environ à 3000 t/min pour rendre la solution optiquement vide. Nous introduisons 0,4 ml de cette solution dans une microcuve MG-4 pouvant contenir de 0,2 à 0,5 ml de solution, que l'on place dans le support décrit dans un précédent article (*loc. cit.*).

Tableau VII. *Détermination et calcul de la teneur en cobalt d'un même échantillon de sang*

Analyse No.	Poids de la prise g	$D_m$ après corrections de cuve	Co trouvé $\mu\text{g}$	$\mu\text{g}$ Co corrigés pour pertes	$\mu\text{g}$ Co corrigés pour blanc	g de Co dans 100 g de sang
1	88,15	0,00659	0,027	0,033	0,027	$31 \cdot 10^{-9}$
2	113,10	0,00881	0,036	0,048	0,042	$37 \cdot 10^{-9}$
3	68,75	0,00478	0,020	0,028	0,022	$32 \cdot 10^{-9}$
4 } 5 }	—	0,00130	0,005	0,006	—	—

On effectue la mesure de la transmission par rapport à une solution contenant tous les réactifs sauf le cobalt, en utilisant le photomultiplicateur pour les mesures des transmissions comprises entre 90 et 100%. Après 5 mesures consécutives, nous vidons et lavons la cuve et la remplissons avec une autre portion de 0,4 ml de la même solution et répétons la mesure des transmissions à nouveau 5 fois. Nous avons donc pour chaque analyse 10 mesures de transmission. Nous déterminons les densités optiques correspondantes et reportons dans la colonne 2 du tableau VII la

valeur moyenne ( $D_m$ ), qui nous sert à déterminer la teneur en cobalt, après avoir effectué les corrections dues aux erreurs de cuves. Dans la colonne 4 nous avons inscrit la teneur en cobalt corrigée par rapport aux pertes (v. tabl. VI). Enfin, dans la colonne 5, nous trouvons la teneur réelle en cobalt de chaque prise, c'est-à-dire corrigée par rapport au blanc (0,006  $\mu\text{g}$  de cobalt).

Nous avons établi, en même temps que ces mesures, une courbe d'étalonnage en suivant la même méthode de dosage que celle utilisée pour les analyses ci-dessus. Cette courbe correspond à celle obtenue dans un article précédent. Comme nous le constatons dans cet article<sup>6)</sup>, l'utilisation des microcuvettes MG-4 engendre, lors du dosage de 0,02 à 0,03  $\mu\text{g}$  de cobalt par ml, une erreur de manipulation de  $\pm 10\%$  environ. Nous observons la même erreur relative en considérant les valeurs obtenues pour les 3 prises, valeurs inscrites dans la colonne 7 du tableau VII.

La teneur moyenne en cobalt de ce sang complet, qui a aimablement été mis à notre disposition par le Centre de Transfusion de l'Hôpital Cantonal de Genève, est donc de 0,33 partie pour  $10^9$  parties de sang (0,33 ppb). Cette détermination a été faite avec une erreur relative de moins de  $\pm 10\%$ . Ce résultat concorde avec les valeurs trouvées par divers auteurs<sup>5)7)</sup>, utilisant d'autres méthodes de séparation et de détermination.

La durée des opérations pour une telle analyse est d'environ 22 heures, dont 12 heures sans surveillance spéciale. Il est bien entendu que le temps nécessaire pour effectuer une série de 10 analyses reste à peu près le même que celui utilisé pour une seule.

Nous remercions le FONDS NATIONAL SUISSE, COMMISSION POUR LA SCIENCE ATOMIQUE, grâce auquel nous avons pu entreprendre ce travail.

#### SUMMARY

A quantitative method for the analysis of cobalt in 50 to 100 g of normal whole blood, without anticoagulants, by spectrophotometry using nitroso-R salt, is discussed. By the use of radiocobalt 60 as a tracer, the loss can be estimated. With a final volume of 0.8 ml of solution, the spectrophotometric measurement is carried out on 0.4 ml contained in a microcell placed on a suitable support, as already described in a previous paper. The quantity of cobalt contained in a sample of normal blood is found to be 0.33 ppb with a relative error of  $\pm 10\%$ . The time necessary for one such assay is about 22 hours, of which 12 are without any special control; that for a series of 10 analyses is not sensibly different.

Laboratoire de Chimie Minérale, de Chimie Analytique  
et de Microchimie de l'Université de Genève

---