

# ANGEWANDTE CHEMIE

HERAUSGEGEBEN VON DER GESELLSCHAFT DEUTSCHER CHEMIKER

67. Jahrgang · Nr. 21 · Seite 637–684 · 7. November 1955

FORTSETZUNG DER ZEITSCHRIFT »DIE CHEMIE«

## Die quantitative Analyse von $^{35}\text{S}$ -Thioharnstoff

Ein Beispiel für die radiometrische Bestimmung von Radio-Schwefel enthaltenden Verbindungen

Von Dr. HANS GÖTTE, Max-Planck-Institut für Chemie, Mainz

und Chemie-Ingenieur GEORG THEIS, Bad Kreuznach

Es wird ein Überblick über die Grundlagen der von Hevesy und Paneth eingeführten quantitativen radiometrischen Analysenmethode gegeben, wobei die Vorteile dieses Verfahrens für die quantitative Bestimmung organischer Substanzen hervorgehoben werden. Anschließend wird an einem Beispiel die quantitative Analyse  $^{35}\text{S}$ -markierten Thioharnstoffs sowohl nach der Methode von Hevesy und Paneth als auch durch Radio-Indikatoren-Verdünnungsanalyse gezeigt.

Es gibt drei Verfahren, um mit Hilfe radioaktiver Atomarten quantitative Analysen auszuführen, die alle auf G. v. Hevesy zurückgehen: Die Aktivierungsanalyse<sup>1)</sup>, das Radio-Indikatoren-Verdünnungsverfahren<sup>2)</sup> und ein weiteres, für das ein die Methode kennzeichnender Name fehlt. Nach dieser letztgenannten Methode haben Hevesy und Paneth die erste quantitative Analyse mittels Radio-Indikatoren vorgenommen<sup>3)</sup>. Sie soll im folgenden daher als Hevesy-Paneth-Analyse bezeichnet werden.

### Hevesy-Paneth-Analyse

Die Hevesy-Paneth-Analyse beruht darauf, daß bei radioaktiv markierten Substanzen mit einheitlicher spezifischer Aktivität, d. h. gleichem Gehalt an Markierungsisotop je Gewichtseinheit, unter vergleichbaren Meßbedingungen Proportionalität zwischen Menge und der im Meßgerät festgestellten Radioaktivität besteht. An Stelle der sonst in der Chemie üblichen Meßmethoden (z. B. Wägung, Volumenmessung, Lichtintensitätsmessung) tritt also die Strahlenmessung. Dabei ist es nicht einmal unbedingt erforderlich, die absolute spezifische Aktivität, also die Anzahl der je Gewichtseinheit vorhandenen  $\text{mC}$  zu kennen. Es genügt vielmehr die Kenntnis der relativen spezifischen Aktivität, d. h. der Anzahl der je Gewichtseinheit unter vergleichbaren Umständen mit einem Geiger-Müller-Zählrohr oder einem Szintillationszähler gemessenen Zählrohrausschläge je Minute bzw. der in einer Ionisationskammer unter entsprechenden Bedingungen gemessenen Ionisationsströme.

Das Hevesy-Panethsche Analysenverfahren ist überall dort anwendbar, wo es möglich ist, die quantitativ zu bestimmende Substanz so stark zu markieren, daß die erhaltenen Meßpräparate eine ausreichende relative Aktivität aufweisen. Die höchste erreichbare Empfindlichkeit ist gegeben durch die Größe der spezifischen Aktivität, die sich bei trägerfreien radioaktiven Atomarten ergibt. So lassen sich z. B. mit einem Fensterzählrohr unter den üblichen Meßbedingungen noch etwa  $3 \cdot 10^{-16} \text{ g}$  reiner  $^{32}\text{P}$ ,  $2 \cdot 10^{-14} \text{ g}$   $^{35}\text{S}$  und  $2 \cdot 10^{-9} \text{ g}$   $^{14}\text{C}$  nachweisen, bzw. eine diesen Gewichten äquivalente Menge markierter Verbin-

dung, wenn zur Radio-Synthese die reinen Radio-Isotope verwendet wurden.

Diese extremen Bedingungen werden im allgemeinen nicht gefordert und sind überdies auch sehr schwer zu erreichen, da man in der Mehrzahl der Fälle mit entspr. geringen Mengen keine Synthesen ausführen kann. Da die Empfindlichkeit in dem Maße sinkt, in dem das radioaktive Isotop mit stabilen vermischt wird, kann man sie durch Zusatz inaktiver Substanz gleicher Art beliebig variieren. Die untere Grenze der Nachweisempfindlichkeit ist dadurch gegeben, daß sich mit einem Geiger-Müller-Zählrohr noch etwa 20 Impulse/min nachweisen lassen. Die quantitativ zu bestimmende Substanz muß also so markiert werden, daß die der erwünschten unteren Nachweisgrenze entsprechende Menge mindestens 20 Zählrohrausschläge/min ergibt.

Welches Quantum eines Radio-Isotops zur Markierung einer analytisch nachzuweisenden Verbindung erforderlich ist, hängt von der Art seiner radioaktiven Strahlung und ihrer Energie sowie von der Empfindlichkeit des Nachweisinstrumentes ab. Aber auch die Eigenschaften des zur Messung verwendeten Stoffes spielen eine Rolle, da die im Präparat entstehende Strahlung mehr oder weniger in der Schicht des zu untersuchenden Stoffes absorbiert werden kann. Schließlich wird die Quantität des benötigten Radio-Isotops auch noch durch die Menge des anfallenden, zur Messung verwendeten Materials bestimmt, da im allgemeinen bei Messung fester Substanzen nicht mehr als 200 mg radioaktive Substanz auf einmal zu messen sind. Als Faustregel kann angenommen werden, daß bei  $\beta$ -Strahlen mit einer Maximalenergie von mehr als 1 MeV 10%, von solchen einer Maximalenergie zwischen 0,1 und 0,2 MeV nur 0,5 bis 1% mit einem geeigneten Fensterzählrohr meßbar sind.

Viel wichtiger als die hohe Empfindlichkeit des Verfahrens ist seine Anwendbarkeit in allen den Fällen, in denen spezifische, selektive und quantitativ verlaufende chemische Reaktionen fehlen oder nicht ausführbar sind. Die radiometrische Methode hat überdies bei der quantitativen Analyse organischer Verbindungen den Vorteil, daß die analytische Operation nicht unbedingt mit der quantitativ zu bestimmenden Substanz selbst vorgenommen werden muß. Sie erlaubt es, die schwierige und oft unbekannte Chemie komplizierter Verbindungen durch die

<sup>1)</sup> G. v. Hevesy u. H. Levi, Kgl. Danske Vidensk. Selsk., mat.-fysiske Medd. 14, [5] [1936]; 15 [11] [1938]. Siehe auch diese Ztschr. 64, 679 [1952].

<sup>2)</sup> G. v. Hevesy u. E. Hofer, Nature 134, 879 [1934].

<sup>3)</sup> G. v. Hevesy u. F. A. Paneth, Z. anorg. Chem. 82, 323 [1913].

jenige der einfachsten Verbindungen des Markierungselementes zu ersetzen, d. h. in der Mehrzahl der Fälle durch die Chemie seiner Ionen in wässriger Lösung. Die markierten Verbindungen werden dazu gemeinsam mit den sie etwa begleitenden Fremdstoffen auf trockenem oder nassem Wege verascht. Das markierte chemische Element und damit die zur Markierung verwendete radioaktive Atomart sind dann in der durch den Oxydationsvorgang bedingten chemischen Form vorhanden und lassen sich meist von den übrigen Oxydationsprodukten abtrennen, sammeln und messen. In dieser Weise können organische Verbindungen, die Schwefel, Phosphor, Arsen oder Halogene enthalten sowie die meisten metallorganischen Verbindungen quantitativ nachgewiesen werden. Man braucht nur das nach der Veraschung anfallende Sulfat, Phosphat, Arsenat usw. oder die betreffenden Metallionen abzuscheiden und auf den Gehalt an radioaktiver Substanz zu untersuchen.

Sehr oft ist die Menge der nachzuweisenden Verbindung so gering, daß die aus ihr nach der Veraschung gewonnene radioaktive Substanz selbst mikrochemisch schwer zu handhaben ist. In diesem Fall setzt man inaktives Material gleicher chemischer Form in bekannter Menge als Träger zu und kann dann mit den Makroverfahren der Chemie arbeiten. Die Zugabe von Trägern kann auch dann erforderlich werden, wenn die zur Messung anfallende Substanz eine zu hohe spezifische Aktivität zeigt. Die zugesetzte Trägermenge muß so groß sein, daß die zu bestimmende Quantität daneben vernachlässigt werden kann. Da sich das vorliegende radioaktive Isotop homogen auf alles Trägermaterial verteilt, genügt es dann, einen beliebigen Teil davon zu messen, um daraus die gesamte Aktivität errechnen zu können.

Umgekehrt ist darauf zu achten, daß die nichtmarkierten Begleitsubstanzen ebenfalls das in den analytisch zu bestimmenden Verbindungen enthaltene und zur Markierung verwandte Element aufweisen können, so daß nun die Menge des zu messenden Materials um einen entsprechenden, häufig unbekannten Betrag größer ist. In derartigen Fällen muß die Gesamtmenge des aktiven Materials zunächst quantitativ bestimmt werden, um von der gemessenen Aktivität eines aliquoten Teiles auf die Gesamtaktivität schließen zu können. Hier wird die Empfindlichkeitsgrenze also zusätzlich durch die u. U. vorhandene Menge Begleitsubstanz beeinflußt. Das gilt besonders bei der Markierung von organischen Molekülen mit  $^{14}\text{C}$ , wenn die zu analysierende Substanz verascht und das entstehende radioaktive Kohlendioxid entweder direkt im Gasstrom, oder nach Überführung in Bariumcarbonat gemessen wird, weil hier die aus organischem und biologischem Begleitmaterial anfallenden Mengen inaktiven Kohlenstoffs besonders groß sind.

Man sieht, daß selbst wenn die quantitativ zu bestimmende Verbindung vor der Analyse chemisch verändert wird — nach den klassischen Analysenverfahren ihre Bestimmung also unmöglich ist — ihre quantitative Analyse dennoch ausgeführt werden kann. Dergleichen analytische Probleme treten z. B. in der Pharmakologie und Ernährungsphysiologie auf, wenn verabreichte Stoffe im Organismus umgebaut werden, evtl. vorhandene spezifische chemische Nachweisreaktionen für sie daher versagen müssen.

### Verdünnungsanalyse

Während bei der Analysenmethode von *Hevesy* und *Paneth* die Aktivität der Gesamtheit aller radioaktiven Atome der zu bestimmenden Substanz oder zum mindesten die eines bekannten Bruchteils davon als Maß

für den gesuchten Stoff dient, beruht das *Radio-Indikatoren-Verdünnungsverfahren* darauf, daß die spezifische Aktivität einer radioaktiv gekennzeichneten Substanz durch Zugabe nicht-markierter Verbindung gleicher Art verringert wird. Man kann mit ihr eine innerhalb eines Stoffgemisches vorliegende Substanz quantitativ bestimmen, ohne sie quantitativ abtrennen zu müssen. Es genügt vielmehr, einen beliebigen Bruchteil chemisch rein zu isolieren und seine Zählrohraktivität zu ermitteln. Damit ist es möglich, Verbindungen quantitativ zu analysieren, die sich nicht gleichzeitig chemisch rein und quantitativ abscheiden lassen. Überdies ist die Methode geeignet, von einer analytisch zu verfolgenden Substanz denjenigen Anteil zu ermitteln, der im Falle einer chemischen Reaktion mit anderen Stoffen nicht umgesetzt zurückbleibt, wenn die entstehenden Reaktionsprodukte stabil sind und nicht mit den Ausgangsmaterialien im Gleichgewicht stehen.

Man muß zwei Variationen dieses Verfahrens unterscheiden. Die eine erlaubt es, radioinaktive Verbindungen zu bestimmen. Dazu wird dem Gemisch, das die zu bestimmende Substanz in unbekannter Menge enthält, eine bekannte Quantität markierter Verbindung gleicher Art und bekannter spezifischer Aktivität zugesetzt und dafür gesorgt, daß sich radioaktives und radioinaktives Material homogen vermischen. Anschließend isoliert man einen beliebigen Bruchteil der quantitativ zu ermittelnden Substanz, d. h. des homogenen Gemisches aus unbekannter radioinaktiver und bekannter radioaktiver Verbindung, und bestimmt die spezifische Aktivität dieser Mischung.

Beträgt die Zählrohraktivität der bekannten zugesetzten Menge  $a$   $z_1$ , so berechnet sich die spezifische Aktivität zu  $S_1 = z_1/a$ . Nach Zugabe der unbekannten Menge sinkt letztere auf den Betrag  $S_2 = z_1/(a+x) = z_2/b$ . Diese wird an dem Bruchteil  $b$ , dessen Zählrohraktivität  $z_2$  ist, gemessen.  $x$  errechnet sich dann aus

$$x = a \left( \frac{S_1}{S_2} - 1 \right).$$

Umgekehrt ist es möglich, durch Zusatz einer bekannten Menge radioinaktiver Verbindung eine unbekannte Menge markierter Substanz zu bestimmen, wenn deren spezifische Aktivität bekannt ist. Das Verfahren eignet sich also dann, wenn man die spezifische Aktivität der zu analysierenden Verbindung durch Bestimmung der Zählrohraktivität einer kleinen Probe  $p$  ermitteln kann. Es ist also  $S_1 = z_p/p = z_x/x$ , wobei  $z_p$  die Zählrohraktivität der Probe  $p$  und  $z_x$  die nicht bekannte Zählrohraktivität der unbekannten Menge der zu bestimmenden Substanz im zu analysierenden Gemisch bedeutet. Nach Zugabe einer bekannten Menge  $a$  nichtmarkierter Verbindung, die ebenfalls homogen mit der im Gemisch vorhandenen gesuchten Substanz vermischt werden muß, ergibt sich die spezifische Aktivität der Mischung radioaktiver und radioinaktiver Verbindung zu  $S_2 = z_x/(x+a) = z_b/b$ , wenn  $z_b$  für die Zählrohraktivität der chemisch rein isolierten Probe  $b$  steht. Die unbekannte Menge der gesuchten Substanz errechnet sich dann zu

$$x = S_1 \cdot a / (S_2 - S_1) = a / \left( \frac{S_1}{S_2} - 1 \right)$$

Die Werte für  $S_1$  und  $S_2$  bzw. für  $x$  und  $a$  müssen bei beiden Methoden genügend verschieden sein, da andernfalls die Ungenauigkeiten durch die Statistik der radioaktiven Messung zu groß werden (vgl. den folgenden Aufsatz von *O. Riedel*).

Die angedeuteten Vorteile der Ausführung einer quantitativen Analyse mit radioaktiv markierten Substanzen mit Hilfe der radiometrischen Methoden lassen sich gut an folgendem Beispiel aufzeigen.

### Quantitativer Thioharnstoff-Nachweis mit der Hevesy-Paneth-Methode

#### Überführung des radioaktiven Schwefels in $^{35}\text{S}$ -Sulfat

Seit einigen Jahren<sup>3a)</sup> werden Citrusfrüchte vor dem Verderben geschützt, indem sie baumfrisch einige Minuten in 2proz. Thioharnstoff-Lösung gebadet werden. Die quantitative Bestimmung des in Fruchtschale und Fruchtfleisch eingedrungenen Thioharnstoffs stößt auf erhebliche Schwierigkeiten, da die Analysenverfahren durch Farbstoffe ge-

<sup>3a)</sup> *J. F. L. Childs u. E. A. Siegler, Ind. Engng. Chem.* 38, 82 [1946].

stört werden<sup>4</sup>). Auf der anderen Seite ist es notwendig, verlässliche Werte über die in die Früchte eindringenden Thioharnstoff-Mengen zu ermitteln, um sicher zu gehen, daß diese unterhalb schädlicher Konzentrationen<sup>5</sup> liegen.

Die nicht vorbehandelten Früchte wurden entsprechend der bei der Thioharnstoff-Konservierung üblichen Praxis 7 min in einer 2proz. Lösung von  $^{35}\text{S}$ -Thioharnstoff, dessen spezifische Aktivität etwa  $7 \cdot 10^{-4}$  mC/mg betrug, gebadet. Nach 24stündigem Trocknen ließ sich der auf den Früchten auskristallisierte Thioharnstoff abbürsten. **[A 471]**

Die so behandelten Früchte wurden dann in der Schale zweimal in aufeinander senkrecht stehenden Ebenen eingeschnitten, darauf die Schale entfernt und Schale sowie Fruchtfleisch getrennt mit rauchender Salpetersäure verascht. Das erhaltene Sulfat konnte anschließend als Bariumsulfat auf seine Aktivität untersucht werden.

#### Messung der Eichkurve und Grundlage der Analysen-Berechnung

Da der  $^{35}\text{S}$  sehr energiearme  $\beta$ -Strahlen emittiert, macht sich schon bei Präparat-Schichtdicken von weniger als  $1 \text{ mg/cm}^2$  die Absorption der  $\beta$ -Teilchen im zu messenden Präparat bemerkbar. Um Präparate verschiedener Schichtdicke vergleichen zu können, ist es daher notwendig, eine Eichkurve aufzunehmen, die die Abhängigkeit der gemessenen Zählrohraktivität einer Substanz einheitlicher spezifischer Aktivität von der Schichtdicke zeigt.

Die für die Aufnahme dieser Eichkurve nötige radioaktive Eichsubstanz ließ sich durch Veraschung von 100 mg des Versuchsthioharnstoffs mit rauchender Salpetersäure gewinnen. Die Veraschungslösung wurde im geeichten Kolben auf 1 l aufgefüllt. Die so gewonnene Standardlösung enthält dann je  $\text{cm}^3$  die Radioaktivität von 100  $\mu\text{g}$ , also etwa  $7 \cdot 10^{-4}$  mC, in Form von  $126,1 \mu\text{g} = 0,0013 \text{ mM}$  Sulfat. Die dem entsprechende Menge Bariumsulfat ist zu gering, um sie oder auch das Zehnfache davon auf Aluminium-Schälchen von 3 cm Ø zu gleichmäßigen Schichten zu verarbeiten oder auf Filterplatten abfiltriert zu werden. Größere Mengen von etwa 200 mg, wie sie zur Aufnahme der vorerwähnten Eichkurve für Präparate größerer Schichtdicke benötigt werden, würden bereits zu hohe Zählrohraktivitäten ergeben. Es ist daher nicht möglich, die Standardlösung direkt zur Herstellung des als Eichsubstanz verwendeten Bariumsulfats zu verwenden, da die spezifische Aktivität des in ihr gelösten Sulfats zu hoch ist. Aus diesem Grunde wird das markierte Sulfat der Standardlösung mit inaktivem Sulfat verdünnt. Um das zur Eichung erforderliche Bariumsulfat herzustellen, werden 20  $\text{cm}^3$  der Standardlösung mit 20 mM Schwefelsäure versetzt, so daß danach eine 1,0013 millimolare Schwefelsäure entsteht. Das aus diesen Lösungen ausgefällte Bariumsulfat enthält also je 1,0013 Millimol die Radioaktivität von 100  $\mu\text{g}$  Versuchsthioharnstoff. Der ausgefällte Niederschlag wurde in einem G4-Filteriegel abgesaugt und bei  $110^\circ\text{C}$  getrocknet. Mit dem so erhaltenen Bariumsulfat wurde eine wässrige Suspension hergestellt und diese in verschiedenen Schichtdicken auf Aluminiumschälchen von 3 cm Ø aufgetragen und sorgfältig gleichmäßig verteilt. Die aufgetragenen Suspensionen ließen sich ohne einzuröhren mit einem Heraeus-Oberflächenstrahler eindampfen und konnten im Trockenschrank bei  $110^\circ\text{C}$  bis zur Gewichtskonstanz getrocknet werden.

Die erhaltene Eichkurve zeigt Bild 1. Es gibt bei jeder Schichtdicke bzw. der ihr entsprechenden Einwage die Zählrohraktivität eines Bariumsulfats an, das je 1,0013 mM die Aktivität von 100  $\mu\text{g}$  der markierten Versuchsubstanz enthält. Sie wurde am 30. 12. 1953 gemessen und die an späteren Tagen gemessenen Schwefel-Aktivitäten innerhalb

der Versuchswerte wurden bezüglich des radioaktiven Abfalls des  $^{35}\text{S}$  (Halbwertszeit 89,1 d) auf diesen Tag korrigiert. Mit Hilfe dieser Eichkurve ist es möglich, unbekannte Mengen des Versuchsthioharnstoffs zu bestimmen,

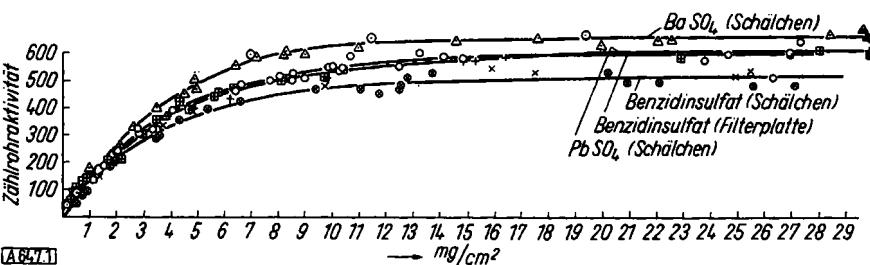


Bild 1

Selbstabsorptionskurven von Bariumsulfat, Bleisulfat und Benzidinsulfat gleicher molspezifischer Aktivität aufgenommen nach der Schälchen-Methode sowie von Benzidinsulfat nach der Filterplatten-Methode

wenn der in ihm enthaltene Schwefel in Bariumsulfat überführt und in dieser Form unter gleichen Bedingungen wie bei der Aufnahme der Eichkurve gemessen wird. Dann verhalten sich die gemessenen Zählrohraktivitäten wie die spezifischen Aktivitäten der untersuchten Bariumsulfat-Niederschläge. Zur Berechnung der unbekannten Thioharnstoff-Menge muß lediglich die Zählrohraktivität des Bariumsulfats, das die Radioaktivität des Thioharnstoffs enthält, auf die Zählrohraktivität umgerechnet werden, die sich ergäbe, wenn sich die Radioaktivität auf 1 mM Bariumsulfat verteilt.

Ganz allgemein ist die Berechnung auf Grund der folgenden Überlegung möglich: a  $\mu\text{g}$ -Versuchsubstanz (im vorliegenden Falle 100  $\mu\text{g}$ ) besitzen die Radioaktivität  $R_1$ . Diese wird bei der Herstellung des Standard-Bariumsulfats auf b  $\text{mg}$  (im vorliegenden Fall 1,0013 mM) Bariumsulfat verteilt. Bei einer beliebigen Schichtdicke gemessen, zeigen h  $\text{mg}$  des Präparats eine Zählrohraktivität  $Z_1$ . Eine unbekannte Menge Versuchsthioharnstoff enthält die Radioaktivität  $R_2$ . Diese wird auf c  $\text{mg}$  Bariumsulfat, — im hier behandelten Fall gegeben durch das zugesetzte Trägersulfat und die aus dem Schwefel der Früchte entstandene Sulfat-Menge — verteilt und ergibt, wenn h  $\text{mg}$  in gleicher Schichtdicke wie zuvor und unter sonst vergleichbaren Bedingungen gemessen werden, eine Zählrohraktivität  $Z_2$ . Es verhält sich

$$\frac{X}{a} = \frac{R_2}{R_1} \quad \text{und} \quad \frac{Z_2}{Z_1} = \frac{R_2/c}{R_1/b},$$

da sich die Radioaktivitäten verhalten wie die Menge der Versuchsubstanz und außerdem unter vergleichbaren Meßbedingungen Proportionalität zwischen den absoluten spezifischen Aktivitäten  $R_1/b$  und  $R_2/c$  und den gemessenen Zählrohraktivitäten  $Z_1$  und  $Z_2$  besteht. Daraus ergibt sich allgemein

$$X = \frac{Z_2 \cdot a \cdot c}{Z_1 \cdot b} \quad \text{und für die hier vorliegenden Bedingungen} \quad X = \frac{100}{233,7} \cdot \frac{c}{Z_1} \cdot Z_2$$

Man hat also Präparate gleicher Schichtdicke zu vergleichen, was aber an Hand der Eichkurve ohne Schwierigkeiten möglich ist, da diese über die Aktivität jeder beliebigen Schichtdicke der Standardsubstanz Auskunft gibt. Es ist also nur erforderlich, ein Präparat beliebiger Schichtdicke aus dem Bariumsulfat, das die Radioaktivität des zu bestimmenden Versuchsthioharnstoffs enthält, herzustellen und zu messen sowie anschließend die Zählrohraktivität bei gleicher Schichtdicke auf der Eichkurve abzulesen. Eine Reihe von Kontrollbestimmungen, bei denen unbehandelte Apfelsinenschalen und unbehandeltes Fruchtfleisch zusammen mit 100  $\mu\text{g}$  des markierten Thioharnstoffs verascht wurden, zeigten, daß bei 5 Versuchen diese Menge mit einer Genauigkeit von etwa 3% wiedergefunden wird. Vgl. auch O. Riedel (folgende Arbeit).

#### Ergebnisse

Unter völlig gleichen Verhältnissen wurden die mit dem radioaktiven Versuchsthioharnstoff behandelten Früchte bzw. ihre Schale und ihr Fleisch verascht und das aus der

<sup>4</sup>) J. W. Grote, J. biol. Chemistry 93, 25 [1931].

<sup>5</sup>) J. Schulmann u. R. D. Keating, ebenda 183, 215 [1950]. J. B. u. C. G. McKenzie, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 54, 34 [1943]. H. S. Dickey u. C. P. Richer, J. Pharmacol. exp. Therapeut. 83, 1951 [1948]. F. B. Flinn u. J. M. Glary, Contr. Boyce Thompson Inst. 17, 241 [1940]. A. Hartzell, ebenda 13, 501 [1942].

Veraschung gewonnene Bariumsulfat gemessen. Tabelle 1 enthält die Ergebnisse dieser Untersuchungen.

Zu den Versuchsergebnissen ist zu bemerken, daß die Früchte, bevor sie mit dem Versuchsthioharnstoff behandelt wurden, nach der Ernte 8 Tage gelagert bzw. während dieser Zeit transportiert worden waren. Es könnte sein, daß sie sich in Bezug auf die Aufnahmefähigkeit für Thioharnstoff, insbes. was die Schale anbetrifft, gegenüber baumfrischen Früchten verändert haben. Dazu kommt, daß das Abbürsten des Thioharnstoffs von Hand nur wesentlich ungleichmäßiger möglich ist, als in den maschinellen Anlagen. In den Schalen ist daher gegenüber der Praxis möglicherweise ein zu hoher Thioharnstoff-Gehalt zu erwarten, der aber den ungünstigsten Fall darstellt.

In der vorgenannten Arbeit<sup>2a)</sup> haben die amerikanischen Autoren die Menge des an den Früchten verbleibenden Thioharnstoffs zu ermitteln versucht, indem sie den Verlust der Badflüssigkeit nach Durchsatz einer größeren Zahl Früchte zugrunde legten. Nach dem Trocknen der Orangen wurde durch Abwaschen der Oberfläche die aufgetrocknete Verbindung, die nur lose anhaftete, entfernt und ihre Menge im Waschwasser kolorimetrisch bestimmt. Aus der Differenz von insgesamt angetrocknetem und abgewaschenem Anteil ergab sich der in der Schale verbleibende Thioharnstoff.

Auch der Thioharnstoff-Gehalt des Saftes und der Schalen wurde kolorimetrisch bestimmt. In Tabelle 1 sind diese Ergebnisse den radiometrisch gefundenen gegenübergestellt.

Berücksichtigt man die doppelte Konzentration des von den amerikanischen Autoren benutzten Bades, so liegen die nach beiden Methoden gewonnenen Werte für 100 g Saft und 100 g Frucht zufriedenstellend beieinander. Die Analysenresultate für 100 g Schale jedoch weichen völlig voneinander ab. Errechnet man den sich für 100 g Schale ergebenden Wert aus den amerikanischen Angaben für 100 g Frucht und 100 g Saft, bzw. 100 g Fleisch unter der Annahme, daß das Verhältnis von Schale zu Fleisch bei den amerikanischen Früchten (etwa 200 g je Stück) das gleiche war wie bei dem zum radioaktiven Verfahren benutzten spanischen (etwa 160 g je Stück), so ergeben sich für 100 g Schale 28 mg. Dieser Wert kommt dem, der sich aus Umrechnung des radiometrisch gefundenen Ergebnisses ergibt ziemlich nahe, wenn man die von den Amerikanern verwendete doppelte Thioharnstoff-Konzentration berücksichtigt.

Es liegt nahe, die Schwierigkeiten der kolorimetrischen Thioharnstoffanalyse in den stark gefärbten Schalenauszügen für die Diskrepanz des Analysenergebnisses verantwortlich zu machen. Es besteht aber auch die Möglichkeit, daß der Thioharnstoff mit in der Schale vorhandenen

Stoffen reagiert und sich so dem kolorimetrischen Nachweis entzieht. Tatsächlich ließ sich (allerdings an anderen, baumfrisch per Luftpost aus Spanien importierten Apfelsinen einer anderen Rasse) mit Hilfe von markiertem Thioharnstoff einer spezifischen Aktivität von 0,125 mC/mg zeigen, daß neben dem Thioharnstoff eine mit dem Farbstoff wandernde Verbindung auftritt, wenn der Schalenabschluß papierchromatographisch getrennt wird.

Autoradiographisch ließ sich außerdem nachweisen, daß der Thioharnstoff ausschließlich im gelben Anteil der Schale lokalisiert war, d. h. am äußersten Rande (Bild 2).



Bild 2

Radiographien von kalottenförmigen Schalenabschnitten einer mit  $^{35}\text{S}$ -Thioharnstoff behandelten Orange. Höhe der Kalotte 2 mm

Man erkennt deutlich, daß über die unverletzte Schale kein Thioharnstoff in die Frucht einzudringen vermag. Es ist daher anzunehmen, daß die in die Früchte eindringenden geringen Thioharnstoff-Mengen nur über den Fruchtknoten bzw. den Stempelansatz ins Innere gelangen und so an der Pulpe hängen bleiben, ohne in das Fleisch zu geraten.

Aus der Schale konnte bei Zimmertemperatur ein alkoholischer Auszug gemacht werden, von dem 2 mm<sup>3</sup> auf einen Filtrierpapierstreifen gebracht und anschließend aufsteigend mit Wasser-Butanol chromatographiert wurde. Zum Vergleich geschah dasselbe mit der 2proz. Lösung des Ausgangsthioharnstoffs, um sicher zu gehen, daß hier nicht innerhalb der drei Monate seit Herstellung des Präparats durch die  $\beta$ -Strahlenwirkung die Bildung anderer Verbindungen stattgefunden hatte<sup>4)</sup>.

<sup>4)</sup> R. M. Lemmon, Nucleonics 11, 44, Okt. [1953].

| Versuchsdaten   | 100 g Fleisch                 | 100 cm <sup>3</sup> Saft | 100 g Schalen                | Thioharnstoff in der Gesamtfrucht   | 100 g Frucht  |  |
|---|-------------------------------|--------------------------|------------------------------|-------------------------------------|---|--|
| <i>Radiometrisch nach Eintauchen in 2proz. Thioharnstoff-Lsg.</i>                           |                               |                          |                              |                                     |   |  |
| 11. 1. 54   | 0,383                         | 0,433                    | 11,3                         | 5,93                                | 3,74  |  |
| 14. 1. 54   | 0,465                         | 0,525                    | 11,8                         | 5,39                                | 3,39  |  |
| 25. 1. 54   | <u>0,398</u>                  | <u>0,449</u>             | (16,5)*)                     | <u>5,53</u>                         | <u>4,03</u>   |  |
| Mittelwert  | 0,382                         | 0,469                    | 11,55                        | 5,58                                | 3,72  | *) Nicht zur Mittelwertbildung benutzt, Schalen deutlich eingetrocknet |
| <i>Kolorimetrisch nach Eintauchen in 5proz. Thioharnstoff-Lsg. (nach Childs u. Siegler)</i> |                               |                          |                              |                                     |   |  |
|   |                               |                          |                              | 12,5<br>7,9–9,3<br>im Mittel<br>8,6 | Berechnet aus Badverlust.<br>Nach 21 d mit Wasser abgewaschen;<br>aus Differenz gegen Waschwasser.    |  |
| Im Fleisch; An-<br>nahme von ~ 8 %<br>Pulpe<br>1,02   | 0,97–1,24<br>im Mittel<br>1,1 |                          | 1,6–2,01<br>im Mittel<br>1,8 |                                     | Nach 19 d im Saft.  |  |
|   |                               |                          | 28                           |                                     | Nach 19 d in Schalen.   |  |
|   | 0,96                          | 1,12                     | 29                           |                                     | Berechnet aus den USA-Angaben für<br>Saft und Gesamtfrucht bei Verhältnis Schale zu Fleisch = 1 : 2,6 |  |
|   |                               |                          |                              | 9,25                                | Berechnet aus radiometrischen Werten für 2,5fache Konz. des Bades.                                    |  |

Tabelle 1. Gegenüberstellung der radiometrisch und kolorimetrisch ermittelten Thioharnstoff-Gehalte

Das Ergebnis zeigt Bild 3. Ein Teil der Radioaktivität wandert im Papierchromatogramm mit dem gelben Farbstoff der Apfelsinenschalen in der Nähe der Lösungsmittelfront ( $R_f = 0,96$ ), während der Ausgangs-Thioharnstoff

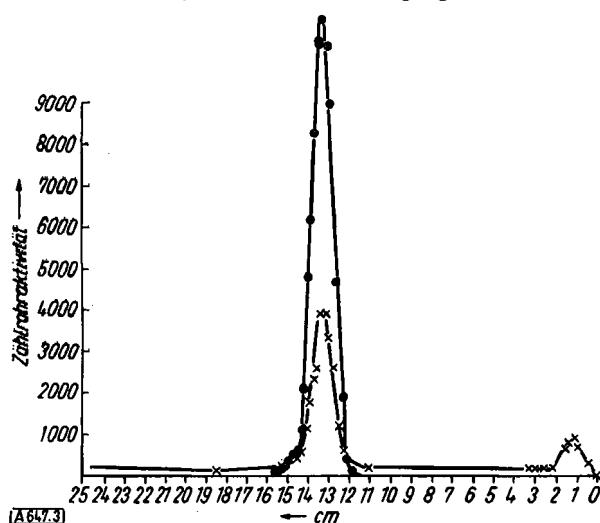


Bild 3  
Radio-Papierchromatogramm eines Auszuges aus mit  $^{35}\text{S}$  Thioharnstoff behandelten Orangenschalen (2 Maxima); sowie einer reinen  $^{35}\text{S}$  Thioharnstoff-Lösung (1 Maximum)

ebenso wie der in der Schale nicht umgesetzte sich durch ein Maximum der Radioaktivität in der Mitte des Streifens findet ( $R_f = 0,54$ ). Wird die Fruchtoberfläche nach der Behandlung abgewaschen, so findet sich im Chromatogramm nur die am Farbstoff gebundene Aktivität. Danach sieht es so aus, als ob der in den Schalen verbleibende Thioharnstoff dort chemisch gebunden wird.

#### Bestimmung des $^{35}\text{S}$ -Thioharnstoffs nach dem Radio-Indikatoren-Verdünnungsverfahren

Die bisher verwendete Analysenmethode erfaßte den gesamten Schwefel des markierten Thioharnstoffs nach Oxydation der organischen Substanz unabhängig von der Form, in der er vorlag. Da die Möglichkeit bestand, daß die in die Schale eingedrungene markierte Verbindung dort mit einer der vorliegenden Substanzen zu einem stabilen Thioharnstoff-Derivat umgesetzt wurde, lag es nahe, mit Hilfe der Radioindikatoren-Verdünnungsanalyse festzustellen, ob diese Umsetzung quantitativ und irreversibel vor sich geht, oder ob eine Anlagerungsverbindung entsteht, in der der Thioharnstoff nur lose gebunden und leicht austauschbar vorliegt.

Zur Analyse wurden eine Reihe baumfrischer mit Luftpost transportierter Apfelsinen durch 5 min dauerndes Baden in 2proz. Thioharnstoff-Lösung konserviert und dann wie üblich getrocknet. Die eine Hälfte der Früchte wurde von überschüssigem angetrocknetem Thioharnstoff nur durch Abbürsten gereinigt, die andere durch zusätzliches Abspülen mit Wasser. Die Apfelsinen wurden wie oben beschrieben geschält und die Schalen von zwei je gleich behandelten Früchten halbiert. Der eine Teil diente zu einer Analyse nach dem Veraschungsverfahren, der zweite zu einer Verdünnungsanalyse. Es war so möglich, die Ergebnisse der beiden Methoden einander gegenüber zu stellen und zu vergleichen. Um zusätzliche Angaben über die in das Fruchtfleisch eingedrungenen Thioharnstoff-Mengen zu erhalten, wurden auch die Fleischanteile zusätzlich nach der Sulfat-Methode untersucht.

Bei der Verdünnungsanalyse wurden die kleingeschnittenen Apfelsinenschalen der mit markiertem Thioharnstoff

konservierten Früchte zunächst in einen Standzylinder gefüllt und mit Äthanol übergossen. Um den vorhandenen Thioharnstoff auszulaugen, mußte der Alkohol verschiedentlich erneuert werden. Nach Durchlaufen von 1,5 l in 5 Tagen zeigte 1 cm<sup>3</sup> des Äthans nach dem Eintrocknen auf einem Aluminiumschälchen keine Schwefel-Aktivität mehr im Zählrohr. In diesem alkoholischen Extrakt wurden dann 1000 mg radioinaktiver Thioharnstoff aufgelöst. Anschließend ließen sich aus der Lösung etwa 100 mg der Verbindung wiedergewinnen.

Der erhaltene radioaktive Thioharnstoff wurde mit Toluol aufgeschwemmt und dann auf Aluminium-Schälchen aufgetragen, so daß nach Verdampfen des Lösungsmittels Präparate gleichmäßiger Schichtdicke entstanden, die gewogen und gemessen werden konnten. Die so gefundenen Zählrohraktivitäten  $z_3$  des aus den Apfelsinen gewonnenen Thioharnstoffs müssen mit den sich bei gleicher Schichtdicke ergebenden Zählrohraktivitäten  $z_1$  des zum Konservieren der Früchte verwendeten markierten Thioharnstoffs verglichen werden. Beide verhalten sich zueinander wie die spezifischen Aktivitäten der untersuchten Substanzen, da sie unter vergleichbaren Meßbedingungen gezählt werden. Die nötige Eichkurve ließ sich im vorliegenden Fall nicht mit dem Versuchsthioharnstoff aufnehmen, da dessen spezifische Aktivität zu groß war. Die markierte Verbindung wurde daher im Verhältnis 1 : 100 mit radioinaktivem Thioharnstoff verdünnt und dieses Material zur Aufnahme der Eichkurve benutzt. Die auf der Kurve abgelesenen Werte  $z_1$  müssen also mit 100 multipliziert werden, um in die Formel eingesetzt werden zu können. Diese lautet

$$x = \frac{100 (z_1 - 1)}{100 (z_3 - 1)}.$$

Die Ergebnisse dieser Messungen sind in der Tabelle 2 zusammengefaßt. In ihr sind die Ergebnisse der Untersuchungen nach dem Verdünnungsverfahren und

| Apfelsinen-Nr.          | Hevesy-Paneth-Analyse        |               | Radio-Isotopen-Verdünnungsanalyse          |                                    |                                       |
|-------------------------|------------------------------|---------------|--|------------------------------------|---------------------------------------|
|                         | mg Thioharnstoff gefunden in |               | mg Thioharnstoff gefunden in 100 g Schalen | Veraschig. d. extrahierten Schalen | Gesamt-Thioharnstoff in 100 g Schalen |
|                         | 100 g Fleisch                | 100 g Schalen |  |                                    |                                       |
| Gebürstet               |                              |               |  |                                    |                                       |
| 1 und 2                 | 0,140                        | 7,01          | 5,33                                       | 1,00                               |                                       |
| 3 und 4                 | 0,123                        | 6,18          | 4,08                                       | 1,00                               |                                       |
| 5 und 6                 | 0,123                        | 6,44          | 5,07                                       | 1,04                               |                                       |
| Mittelwerte             | 0,129                        | 6,54          | 4,83                                       | 1,01                               | <u>5,84</u>                           |
| Gebürstet und gewaschen |                              |               |  |                                    |                                       |
| 1 und 2                 | 0,112                        | 5,67          | 4,87                                       | 0,983                              |                                       |
| 3 und 4                 | 0,102                        | 4,90          | 4,14                                       | 0,914                              |                                       |
| 5 und 6                 | 0,220                        | 6,92          | 4,83                                       | 0,988                              |                                       |
| Mittelwerte             | 0,145                        | 5,83          | 4,61                                       | 0,962                              | <u>5,572</u>                          |

Tabelle 2  
Vergleich der Ergebnisse der Hevesy-Paneth-Analyse mit den Ergebnissen der Radio-Isotopen-Verdünnungsanalyse

nach der Hevesy-Paneth-Methode einander gegenübergestellt. Die Verdünnungsanalytisch gefundenen Werte liegen gegenüber den mit der Sulfat-Methode gefundenen zu tief, jedoch beträgt der Unterschied nur etwa 20%, während bei Umsetzung des Thioharnstoffs in ein stabiles Derivat entsprechend den Überlegungen der Tabelle 1 weit größere Unterschiede zu erwarten gewesen wären. Es ist daher wohl die Annahme gerechtfertigt, daß es sich bei der mit dem gelben Farbstoff im Chromatogramm wandernden radioaktiven Substanz um eine Additionsverbindung handelt. In dieser scheint der angelagerte Thioharnstoff so locker gebunden zu sein, daß er mit dem der Verdün-

nungsanalyse im großen Überschuß angebotenen radioaktiven Thioharnstoff austauscht, so daß er bei dieser Art der Analyse wie freier Thioharnstoff in Erscheinung tritt, bei der kolorimetrischen Analyse aber nicht erfaßt wird.

Nach der Veraschung der extrahierten Schalenrückstände und der Bestimmung ihres Thioharnstoff-Gehalts nach der Sulfat-Methode ergab sich, daß etwa  $\frac{1}{5}$  des Thioharnstoffs unter den eingehaltenen Versuchsbedingungen nicht extrahiert worden war. Rechnet man die sich so ergebende Thioharnstoff-Menge zu den verdünnungsanalytisch gefundenen Werten hinzu, so erhält man eine sehr viel bessere Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen der beiden Methoden.

Die Thioharnstoff-Gehalte dieser zweiten Untersuchungsserie sind geringer als die der ersten. Dies dürfte darauf zurückzuführen sein, daß die Eintauchzeit bei der ersten Versuchsserie 7 min, bei der zweiten jedoch nur 5 min betrug. Außerdem ist darauf hinzuweisen, daß die Apfelsinen der ersten Versuchsserie einen 8-tägigen Bahntransport aus Spanien hinter sich hatten, während die der zweiten mit Luftpost ankamen. Schließlich wurden bei der ersten Versuchsserie die Apfelsinen in einer nur mit  $300 \text{ cm}^3$  Lösung gefüllten 5-l-Flasche, die um ihre Längsachse gedreht wurde, gebadet, so daß die Früchte dabei übereinanderfielen und sich intensiv aneinander rieben. Die Apfelsinen der zweiten Serie wurden hingegen in das in einem Becherglas befindliche Bad eingetaucht, was mehr den Bedingungen der Praxis entspricht. Es ist möglich, daß der schonendere und kürzere Transport die Oberflächen der Früchte in besserem Zustand erhalten hat.

### Bemerkungen zu den Messungen

Für die Messungen der radioaktiven Präparate wurde ein Fensterzählrohr mit einem Fenster von  $1,6 \text{ mg/cm}^2$  Glimmer verwendet. Die genannte Zählanordnung konnte mit einem  $\text{Ba}^{14}\text{CO}_3$ -Standard auf einwandfreies Arbeiten während der Messung kontrolliert werden. An Hand eines mit  $^{35}\text{S}$  markierten Bariumsulfat-Präparates ließ sich über die Dauer der Versuche hinaus der Abfall der Schwefel-Aktivität aufnehmen und so feststellen, daß keine Fremdaktivitäten beigemischt waren. Sämtliche Messungen wurden so ausgeführt, daß der statistische Fehler 1 % bis 1,5 % betrug. Die teilweise größeren Schwankungen der Eichkurve und der Meßpräparate liegen in der durch die Herstellung der Meßpräparate bedingten Ungenauigkeit. Hier gehen Wägefehler, Auffüll- und Pipettenfehler, Fehler die bei der Ausfällung des Bariumsulfats auftreten, Uneinheitlichkeit der Schichtdicke im einzelnen Präparat, geringfügige Ungleichheit in der Ausdehnung des Präparats und vielleicht auch etwas variierende Oberflächenbeschaffenheit der Meßpräparate zusätzlich als Fehler ein. Die im Anschluß publizierte Arbeit von O. Riedel wertet die dabei auftretenden Gesamtfehler aus.

Im Rahmen der Versuche wurden überdies vergleichende Untersuchungen darüber angestellt, welches der schwerlöslichen Sulfate für die Messung des  $^{35}\text{S}$  in Sulfat-Form am geeignetesten sei. Geprüft wurden Barium-, Blei- und Benzidinsulfat. Die mit Präparaten gleicher spezifischer Aktivität je Mol aufgenommenen Kurven zeigt Bild 1.

Demnach ist das Bariumsulfat unter den vorliegenden Umständen die geeignete Meßsubstanz. Es ergibt die größte maximal beobachtbare Zählrohraktivität. Da die Veraschungslösungen aus den Früchten Magnesium und Eisen enthalten, die beide die Fällung des Benzidins störend beeinflussen, ergab sich auch aus dieser Tatsache die Notwendigkeit, Bariumsulfat zu verwenden.

Das Benzidinsulfat kann jedoch in anderen Fällen außerordentlich günstig verwendet werden. Es läßt sich sehr gut zu gleichmäßigen Schichten in den benutzten Aluminium-Schälchen ausbreiten, bietet aber vor allem

gegenüber dem Bariumsulfat einen Vorteil, wenn man die von van Slyke<sup>7)</sup> eingeführte Filtrierplattenmethode anwendet. Nach diesem Verfahren wird der Niederschlag mit der in Bild 4 skizzierten Filtrierapparatur abfiltriert und die Filterplatten (Schott G 4, 3 cm Ø) mit dem Niederschlag werden getrocknet, gewogen und gemessen. Eine

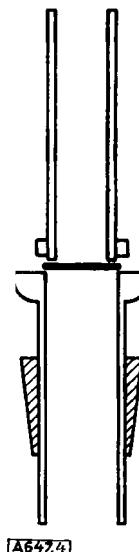


Bild 4  
Filtriereinrichtung zur Gewinnung von Meßpräparaten nach der Filterplatten-Methode

A6474

Eichkurve mit Benzidinsulfat gleicher spezifischer Aktivität nach der Filterplatten-Methode aufgenommen, zeigt ebenfalls Bild 1. Die gegenüber der Kurve, die mit gleicher Substanz nach der Schälchen-Methode aufgenommen wurde, größere Zählrohraktivität erklärt sich dadurch, daß sich die Präparatschichten auf den Filterplatten einige Millimeter näher am Zählrohrfenster befanden als die in dem Schälchen, so daß unter etwas günstigeren geometrischen Bedingungen gemessen wurde. Da das Benzidinsulfat im Gegensatz zum Bariumsulfat leicht mit Alkali von der Platte herunter gelöst werden kann, eignet sich diese Substanz besonders gut für das Filterplatten-Verfahren. Dazu kommt, daß das voluminöse Benzidinsulfat auch noch bei dünnen Schichtdicken eine gleichmäßig zusammenhängende Schicht auf der Filterplatte gibt, während das Bariumsulfat bei dünnen Schichten in die Vertiefungen oder die Körnung eindringt und die Schicht ungleichmäßig wird.

### Zusammenfassung

Es wurden Citrusfrüchte mit einer 2proz. Lösung von  $^{35}\text{S}$ -Thioharnstoff behandelt, um festzustellen, welche Mengen des als Konservierungsmittel verwendeten Thioharnstoffs bei diesem Verfahren in Fruchtfleisch und Fruchtschale eindringen. Sowohl mit Hilfe der Hevesy-Panethschen Analysenmethode als auch auf verdünnungsanalytischem Weg läßt sich zeigen, daß die aufgenommenen Thioharnstoff-Mengen je nach dem Zustand der Früchte 5 bis 11 mg je 100 g Schalenmaterial und 0,1 bis 0,3 mg je 100 g Fruchtfleisch betragen.

Eingeg. am 12. Februar 1955 [A 647]

<sup>7)</sup> D. D. van Slyke, R. Steele u. J. Plazin, J. biol. Chemistry 192, 769 [1951].