

Die Messung von ^{14}C und ^3H in der Gasphase

Von Priv.-Doz. Dr. H. SIMON*), Dr. H. DANIEL und Dr. J. F. KLEBE

Organisch-chemisches Institut der Technischen Universität, Berlin-Charlottenburg

Die Messung von Kohlenstoff-14 und insbesondere Tritium in der Gasphase ist der Messung im festen Zustand an Genauigkeit und Empfindlichkeit weit überlegen. Es werden zuverlässige, im Routinebetrieb anwendbare Verfahren beschrieben. Mit der ^{14}C -Bestimmung kann eine Bestimmung des prozentualen Kohlenstoff- und Wasserstoff-Gehaltes mit der üblichen mikroanalytischen Genauigkeit verbunden werden.

Einleitung

Auf Grund der beherrschenden Stellung der Elemente Kohlenstoff und Wasserstoff in der organischen Chemie und Biochemie werden Kohlenstoff-14 und Tritium als radioaktive Indikatoren sehr häufig verwendet, weshalb Methoden zur analytischen Bestimmung dieser Isotope besonders wichtig sind.

Die Leistungsfähigkeit dieser Methoden ist für die Genauigkeit der Ergebnisse und damit für den bei der Synthese oder Isolierung der radioaktiv markierten Verbindung notwendigen Aufwand, mitunter sogar für die Möglichkeit der Bearbeitung eines Problems überhaupt entscheidend. Die erreichbare Meßgenauigkeit hängt eng mit den angewandten analytischen Methoden und diese wieder mit den Eigenschaften der Strahlung von Kohlenstoff-14 und Tritium zusammen. ^{14}C sendet eine sehr weiche β -Strahlung aus (Maximalenergie 0,156 MeV), die bereits durch eine etwa 10 μ dicke Aluminium-Schicht (Halbwertsdicke = 3 mg/cm²) zu 50% absorbiert wird. Die noch viel energieärmere β -Strahlung des Tritiums (Maximalenergie 0,018 MeV) wird bereits durch eine 0,1 μ dicke Aluminium-Schicht zur Hälfte absorbiert.

Bei der Messung einer weichen β -Strahlung mit Endfenster-Zählrohren treten durch Absorption im Zählrohrfenster beträchtliche Verluste auf, die sich durch extrem dünne Fenster aus Glimmer oder Kunststoff-Folien (Schichtdicken < 1,5 mg/cm²) verringern aber nicht vermeiden lassen. Selbst die dünnsten Fenster absorbieren die β -Strahlung von Tritium noch vollständig, weshalb man Durchflußzählrohre, die keine abschließenden Fenster besitzen, verwenden muß.

Für die Zahl der Impulse pro Minute (ipm), die ein mit einem Geiger-Müller-Zählrohr verbundenes Registriergerät anzeigt, ergibt sich eine Abhängigkeit nach der Gleichung

$$\text{ipm} = A \cdot a \cdot s \cdot g \cdot b \cdot e + \text{NE}$$

Dabei bedeutet: A = Aktivität der Probe, a = Absorptionsfaktor, s = Selbstabsorptionsfaktor, g = Geometriefaktor, b = Rückstreuungsfaktor, e = Ansprechwahrscheinlichkeit des Zählgerätes, NE = Nulleffekt des Zählgerätes.

Aus dieser großen Zahl von Faktoren sieht man sofort, daß im allgemeinen nur Relativmessungen möglich sind, deren Genauigkeit stark von der Reproduzierbarkeit der Proben und ihrer Lage zum Zählrohr abhängt.

Die Größen sind keine allgemeingültigen Konstanten, sondern gelten nur für eine gegebene Zählordnung. Beispielsweise haben verschiedene Verbindungen verschiedene Selbstabsorptionskurven¹⁾, die auch vom Zustand der Proben abhängen. So fanden Wick und Mitarb.²⁾ zwischen den Selbstabsorptionskurven von Bariumcarbonat-Proben,

die sich lediglich in der Korngröße unterschieden, Differenzen bis zu 10%! Daraus ergibt sich, daß die Radioaktivität verschiedener chemischer Verbindungen nur dann quantitativ vergleichbar ist, wenn diese streng vergleichbar in das gleiche Derivat überführt wurden. Zur Messung von ^{14}C verbrennt man normalerweise das organische Material und fällt das aufgefangene CO₂ als Bariumcarbonat. Feste Präparate mißt man entweder in „unendlich dicker“ oder in „unendlich dünner“ Schicht³⁾, da in den mittleren Abschnitten der Selbstabsorptionskurven die Korrekturfaktoren besonders stark von der Beschaffenheit der Proben abhängen. Es kann aber vorkommen, daß die Selbstabsorptionskurven nicht durch den Nullpunkt gehen⁴⁾, wodurch die Abhängigkeit der Zählausbeute von der Schichtdicke bei dünnen Schichten nicht mehr linear ist.

Bei der Messung in unendlich dicker Schicht kann sich eine Komplikation daraus ergeben, daß die Strahlung des Präparates nicht nur aus β -Teilchen besteht, sondern harte Röntgenstrahlung enthält, die beim Abbremsen der β -Teilchen entsteht⁴⁾. Dies führt zu einer Abweichung der bei hohen Schichtdicken gradlinigen Selbstabsorptionskurve vom waagerechten Verlauf, die besonders bei Präparaten mit hoher spezifischer Aktivität stärker in Erscheinung tritt. Es hat daher keinen Sinn, Meßpunkte bei sehr großen Schichtdicken aufzunehmen.

In Durchflußzählrohren kommt es, hauptsächlich bei der Messung von Bariumcarbonat-Proben, zu elektrostatischen Aufladungen der Teilchen, was die Zählausbeute stark beeinflusst. Zur Beseitigung dieser Störung entwickelte Ljunggren⁵⁾ einen „ion blower“. Als andere Maßnahme wird die Mischung der Probe mit Graphit vorgeschlagen⁶⁾.

Die Fehler, die durch die bisher geschilderten Schwierigkeiten bei quantitativen Vergleichsmessungen von Präparaten weicher β -Strahlung entstehen, lassen sich durch sorgfältiges Arbeiten und entsprechende Erfahrung einigermaßen klein halten, wenn die spezifische Radioaktivität der Proben genügend groß ist. Ist jedoch die Radioaktivität der Probe so klein, daß sie den Nulleffekt des Meßgerätes nur wenig übersteigt, so sind die Meßergebnisse auf Grund der statistischen Natur des radioaktiven Zerfalls mit relativ großen Fehlern behaftet. Erreicht z. B. die Radioaktivität eines Präparates nur das Doppelte des Nulleffektes, so ist das Meßergebnis nach 20 min Meßdauer noch mit einem mittleren statistischen Fehler von $\pm 8\%$ behaftet und nach 3 h 20 min immer noch mit einem Fehler von $\pm 2,4\%$. Besonders bei biochemischen Studien tritt häufig der Fall ein, daß man große Mengen Material von geringer spezifischer Radioaktivität hat. Das Produkt aus

*) Neue Anschrift: Organisch-chemisches Institut der Technischen Hochschule, München.

¹⁾ Als Selbstabsorptionskurve bezeichnet man die Abhängigkeit der von einer bestimmten Zählordnung registrierten Impulse von der Schichtdicke (mg/cm²) des zu messenden Materials.

²⁾ A. N. Wick, H. N. Barnett u. N. Ackermann, *Analyt. Chem.* 21, 1511 [1949].

³⁾ Bei der unendlich dünnen Schicht herrscht noch eine lineare Abhängigkeit zwischen gemessenen Impulsen und Substanzmenge, d. h. es tritt noch keine Selbstabsorption auf. Bei der unendlich dicken Schicht dagegen ist die gemessene Impulszahl unabhängig von der Substanzmenge und damit im Idealfall konstant.

⁴⁾ O. Riedel, diese Ztschr. 67, 643 [1955].

⁵⁾ K. Ljunggren, *Intern. J. Appl. Radiation and Isotopes* 2, 105 [1957].

⁶⁾ T. E. Barkes, J. C. Crawhall u. D. G. Smyth, *Biochem. J.* 64, 411 [1956].

spezifischer Radioaktivität und Substanzmenge kann groß sein, ohne daß man bei der Messung in fester Form, bedingt durch die Selbstabsorption, einen brauchbaren Meßeffect erhält. Hat man z. B. 1 g Bariumcarbonat, so läßt sich selbst bei Verwendung fensterloser Durchflußzählrohre von 3–4 cm² Öffnung nur 1–2% der radioaktiven Strahlung erfassen.

Diese Schwierigkeit läßt sich bekanntlich umgehen, indem man das radioaktive Isotop in gasförmiger Verbindung in ein Zählrohr oder eine Ionisationskammer bringt^{7–15}). Es lassen sich so auch mit größeren Materialmengen geringer spezifischer Radioaktivität Zählausbeuten von 60–90% erreichen. Eine andere Möglichkeit besteht darin, gelöste Präparate mit Szintillations-Zählrohren zu messen, was jedoch einen größeren Aufwand erfordert und vorläufig im organischen oder biochemischen Laboratorium gegenüber Messungen in der Gasphase noch keinen Vorteil hat, wenn Substanzen, die sich beispielsweise in ihren Lösungseigenschaften und ihrem Löschvermögen stark unterscheiden, gemessen werden müssen.

Problemstellung

Wir begannen vor etwa 4 Jahren, uns mit der Analyse von Kohlenstoff-14 und später Tritium in der Gasphase zu beschäftigen mit dem Ziel, für den Routinebetrieb ein Verfahren zu finden, das folgenden Bedingungen genügt:

1. Es sollte ohne memory-Effekt arbeiten, da sich im praktischen Betrieb die Radioaktivitäten verschiedener Proben häufig um 2–3 Zehnerpotenzen unterscheiden.

2. Die analysierte Substanzmenge sollte bei gleichbleibender Genauigkeit der Messung um den Faktor 10–20 variabel sein.

3. Der Kohlenstoff- und Wasserstoff-Gehalt der Proben sollte gleichzeitig und mit der üblichen mikroanalytischen Genauigkeit bestimmbar sein, um eine besondere CH-Bestimmung, die als Reinheitskriterium und als Kontrolle für eine 100proz. Verbrennung notwendig ist, zu erübrigen. Allerdings ist die Bestimmung von Tritium nur dann ohne memory-Effekt möglich, wenn man auf die gleichzeitige Analyse des gesamten Wasserstoff-Gehaltes der Probe verzichtet.

4. Die Genauigkeit sollte so groß sein, daß Isotopieeffekte, deren Bestimmung für die Bearbeitung von Reaktionsmechanismen wichtig ist, noch sicher gemessen werden können.

Außerdem war zu beachten, daß ein Zählgas nur dann eine für die Substanz repräsentative Radioaktivität haben kann, wenn es durch eine vollständig verlaufende Umsetzung gewonnen wurde. Verbrennt man beispielsweise eine im Benzolkern mit ¹⁴C markierte Phthalsäure oder Salicylsäure nicht restlos, so stammt das gewonnene Kohlendioxyd zu einem größeren Teil aus den Carboxyl-Gruppen als deren Prozentgehalt im Gesamtmolekül entspricht, d. h. die gemessene Radioaktivität ist zu klein. Bei Tritium-Analysen können durch unvollständige Reaktionen Isotopieeffekte auftreten, die zu falschen Meßergebnissen führen.

Da insbesondere Gaszählrohre nur dann eine konstante Zählausbeute und ein gutes Zählrohrplateau liefern, wenn die Zählgase nicht durch andere Gase oder Dämpfe wie

Sauerstoff, Schwefeloxyde, Halogene oder Wasserdampf verunreinigt sind, muß darauf geachtet werden, daß unabhängig von der Zusammensetzung der zu analysierenden Substanz keine störenden Gase in das Zählrohr gelangen.

Messung von ¹⁴C in der Gasphase

1. Messung in Ionisationskammern^{7–9})

Prinzipiell können alle Gase und Mischungen, die die Kammerwandungen nicht angreifen, in Ionisationskammern gemessen werden. Da die Reinheit der verwendeten Meßgase nicht kritisch ist, können Gasmischungen aus irgendwelchen chemischen Umsetzungen direkt durch die Ionisationskammern geleitet werden. Nachteilig insbesondere bei der Messung geringer Radioaktivitäten ist die hohe Empfindlichkeit der Isolatoren. Eine evakuierte und wieder gefüllte Ionisationskammer benötigt etwa eine Stunde, bis sie einen konstanten Meßwert liefert. Auch die eigentliche Messung und deren Auswertung dauert verglichen mit Messungen in Zählrohren recht lange. Die Meßinstrumente müssen in temperatur- und feuchtigkeits-konstanten Räumen aufgestellt werden. Der Nulleffekt einer Ionisationskammer kann durch einfache Abschirmung nicht wesentlich verkleinert werden. Eine Ionisationskammer mit guten Isolatoren kostet etwa 10mal mehr als ein Gaszählrohr.

2. Messung in Gaszählrohren

Gaszählrohre können im Proportionalbereich oder im Geiger-Müller-Bereich betrieblen werden^{10–18}). Für die gestellte Aufgabe haben Proportionalzählrohre den Vorteil kürzerer Impulsdauer. Aus diesem Grund können höhere Radioaktivitäten ohne Koinzidenzverluste gemessen werden. Wie De Vries und Barendsen¹⁹) gezeigt haben, kann man für Proportionalzählrohre Kohlendioxyd bis zu relativ hohen Drucken als alleiniges Füllgas verwenden. Bei hohen Drucken und mit guter äußerer elektronischer Verstärkung erhält man mit Proportionalzählrohren ausgezeichnete lange Plateaubereiche, die eine geringere Abhängigkeit von der Spannung zeigen, als die der meisten Geiger-Müller-Zähler²⁰).

Zu Beginn unserer Untersuchungen verglichen wir Gaszählrohre aus Glas²¹) und Metall²²), wobei sich herausstellte, daß letztere überlegen sind:

1. Metall ist mechanisch stabiler als Glas. Verwendet man poliertes, vernickeltes Messing, so sind die Zählrohre auch gegen Quecksilber-Dämpfe, die durch die Manometerfüllung der Vakuumapparatur nicht zu vermeiden sind, resistent.

2. Für Proportionalzählrohre, die mit hohen Kohlendioxyd-Partialdrucken und daher mit hohen Spannungen und hoher Verstärkung betrieben werden, ist die Frage der Isolation von besonderer Wichtigkeit. Bei Zählrohren aus Glas treten schon bei 2800–3000 V durch die Wasserhaut des Glases Kriechströme auf, die zu unkontrollierbaren Entladungen führen. In Zählrohren aus Metall kann man beispielsweise Teflon als Isoliermaterial benutzen, dessen Isolationseigenschaften bedeutend besser sind als die von Glas.

3. Die beiden von uns geprüften Glaszählrohre zeigten nur bei Fülldrucken unter 200 Torr die Andeutung eines Zählrohrplateaus bei etwa 2600 Volt, während die Metallzählrohre noch bei Drucken von 450 Torr Kohlendioxyd und 50 Torr Äthan Zählrohrplateaus von 300–400 Volt

⁷) B. M. Tolbert, UCRL-3499 [1956] und Arch. Biochem. Biophysics 60, 301 [1956].

⁸) K. E. Wilzbach, L. Kaplan u. W. G. Brown, Science [Washington] 118, 522 [1953].

⁹) K. E. Wilzbach, A. R. van Dyken u. L. Kaplan, Analytic. Chem. 26, 880 [1954].

¹⁰) R. Wolfgang u. C. F. Mackay, Nucleonics 16, (10), 69 [1958].

¹¹) R. J. Kokes, H. Tobin jr. u. P. H. Emmett, J. Amer. chem. Soc. 77, 5860 [1955].

¹²) J. B. Evans u. J. E. Willard, J. Amer. chem. Soc. 78, 2908 [1956].

¹³) R. L. Wolfgang u. F. S. Rowland, Analytic. Chem. 30, 903 [1958].

¹⁴) P. Riesz u. K. E. Wilzbach, J. phys. Chem. 62, 6 [1958].

¹⁵) Übersicht über ³H-Bestimmungen: F. M. Sinex, Nucleonics 16, (3), 65 [1958]; Proceedings of the Symposium on Tritium in Tracer Applications, New York, 1957.

¹⁶) E. Fünfer u. H. Neuert; Zählrohre und Szintillationszähler, G. Braun, Karlsruhe, 1954.

¹⁷) S. A. Korff: Electron and Nuclear Counters, D. van Nostrand Company, Inc., Toronto-New York-London 1955.

¹⁸) E. Broda u. T. Schönfeld: Radiochemische Methoden der Mikrochemie, Springer-Verlag, Wien 1955.

¹⁹) H. De Vries u. G. W. Barendsen, Physica 18, 652 [1952]; 19, 987 [1953].

²⁰) W. Bernstein u. R. Ballentine, Rev. sci. Instruments 20, 347 [1948].

²¹) R. F. Glascock: Isotopic Gasanalysis for Biochemists, Academic Press Inc., New York 1954.

²²) Gefertigt von der Firma Prof. Berthold, Wildbad i. Schwarzwald.

Länge mit einer durchschnittlichen Steigung von weniger als 1,2% ergeben.

Der Durchmesser des Zählrohrdrahtes in den von uns verwendeten Zählrohren beträgt 0,1 mm. Dies ist ein Kompromiß zwischen mechanischer Stabilität und elektrischen Eigenschaften. Je kleiner der Drahtdurchmesser, desto geringer wird bei gegebenem Fülldruck die notwendige Betriebsspannung und damit die Störanfälligkeit des Rohres. Die Güte des Zählrohrplateaus beim Betrieb von Proportionalzählrohren hängt — einwandfreie mechanische Ausführung des Gerätes, insbesondere völlige Homogenität des Drahtes vorausgesetzt — im wesentlichen vom Proportionalverstärker ab. Die Verstärkung muß genügend groß und der Verstärker übersteuerungsfest sein, d. h. sehr kleine Impulse müssen noch erfaßt, sehr große Impulse dürfen nur einfach gezählt werden. In welchem Maße dies bei der von uns verwendeten Meßanordnung mit Zählrohren aus Metall der Fall ist, zeigen die über Jahre hin praktisch konstant gebliebenen Nulleffekte, die unter 5 cm Blei bei einem 100-ml-Zählrohr etwa 50–55 ipm betragen, sowie die konstante statistische Reinheit.

Um zur Kontrolle der Zählrohre²³⁾, des Zählgerätes²⁴⁾, der Mengenmessung des Kohlendioxyds und zum Vergleich der Zählausbeute verschiedener Zählrohre einen Standard zu haben, wurde eine 3-Liter-Stahlflasche mit radioaktivem Kohlendioxyd gefüllt, das etwa $1,8 \cdot 10^4$ ipm/mMol in den Gaszählrohren ergibt. Da man für eine Messung nur 0,5 mMol Kohlendioxyd braucht, reicht der Inhalt der Stahlflasche für viele Tausend Messungen, d. h. für viele Jahre. In ein Zählrohr, das seit 2,5 Jahren in Betrieb ist, wurden von diesem Standard-Kohlendioxyd sechs verschiedene Mengen eingefüllt und die Impulszahl pro Minute und Millimol (ipm/mMol) bestimmt. Das Ergebnis gibt folgende Tabelle:

1. 17660 ipm/mMol	4. 17658 ipm/mMol
2. 17655 ipm/mMol	5. 17714 ipm/mMol
3. 17544 ipm/mMol	6. 17613 ipm/mMol

Mittelwert: 17641 ipm/mMol. Der mittlere Fehler der Einzelmessung beträgt $\pm 0,33\%$

Tabelle 1
Reproduzierbarkeit der Radioaktivitätsanalyse eines Kohlendioxyd-Hilfsstandards

Als Zählrohrfüllung benutzen wir eine Mischung von Kohlendioxyd und Äthan. Da bei der Verbrennung stark wechselnde Mengen Kohlendioxyd anfallen — sie können zwischen 0,05 und 3,5 mMol liegen — müssen wechselnde Mengen nichtradioaktives Gas dem Zählrohr zugeführt werden, um einen konstanten Fülldruck zu haben. Dafür kann reines Kohlendioxyd verwendet werden. Erfahrungsgemäß ergeben jedoch Zusätze von organischen Gasen oder Dämpfen bessere Zählrohrplateaus. Wir wählten daher Methan oder Äthan. Letzteres hat den Vorteil, sich wie Kohlendioxyd mit flüssiger Luft ausfrieren zu lassen.

Mit steigendem Kohlendioxyd-Gehalt des Zählgases werden die Zählrohrplateaus²⁴⁾ nach höheren Spannungen verschoben und auf 300–400 Volt verkürzt. Bei einem Äthangehalt von weniger als 30% sind die Zählrohre sofort nach ihrer Füllung konstant. Daher benutzen wir, falls wir nicht bei Atmosphären-Druck arbeiten, zum Auffüllen der Gaszählrohre eine Mischung von 70% nichtradioaktivem Kohlendioxyd und 30% Äthan, die wir uns in einer Stahlflasche bereiten.

Verbrennung der organischen Substanzen

Alle üblichen Methoden der Naß- und Trockenverbrennung bzw. ihre Kombination haben Nachteile: bei der Naßverbrennung ist es nicht möglich, gleichzeitig den Wasser-

stoffgehalt der Verbindung zu bestimmen. Bei der Trockenverbrennung ist es nicht möglich, den Maßstab stark zu variieren; außerdem muß eine ganze Reihe von Bedingungen speziell der Isotopen-Analyse angepaßt werden²⁵⁾. Diese Nachteile fallen fort, wenn die Substanzen in kleinen Bombenrohren oxydiert werden, was gleichzeitig den Vorteil hat, daß die Arbeitsweise bei der ¹⁴C- und ³H-Bestimmung methodisch gleich ist. Ein Verfahren, organische Substanzen zur Radioaktivitäts-Analyse in Bombenrohren zu oxydieren, wurde von Wilzbach und Sykes²⁶⁾ angegeben. Wir haben dieses Verfahren modifiziert und untersucht, welche Bedingungen einzuhalten sind, um reines Kohlendioxyd zu erhalten und das Wasser quantitativ zu erfassen. Vermischt man die Substanz nur mit Kupferoxyd²⁶⁾, so werden nach unseren Erfahrungen häufig zu tiefe Kohlenstoff-Werte gefunden, weil manche organischen Stoffe beim Erhitzen verdampfen, Kupferoxyd aber bei 650°C noch keinen nennenswerten Sauerstoff-Druck besitzt und daher nur Substanzen oxydiert, mit denen es sich in unmittelbarem Kontakt befindet.

Verbindungen, die nur C, H, O enthalten, werden daher mit Kaliumperchlorat erhitzt. Enthält eine Verbindung neben C, H, O noch Stickstoff, Halogen oder Schwefel, so wird außerdem feines Kupferoxyd zugegeben. Liegen Alkali- oder Erdalkalisalze oder Carbonate vor, so wird die Analysenprobe mit Vanadinpentoxyd vermischt. Auch Silber- oder Alkalicyanide lassen sich auf diese Weise quantitativ zu CO₂ oxydieren. Wir haben sorgfältig geprüft, ob das Kohlendioxyd, das bei der Oxydation von organischen Substanzen mit Kupferoxyd-Kaliumperchlorat anfällt, auch bei Vorhandensein von Stickstoff, Schwefel und Halogen^{26a)} in verschiedenen Bindungsarten als Zählgas geeignet ist.

Das Verfahren der Oxydation im Bombenrohr hat gegenüber der Naß- oder Trockenverbrennung außer der großen Zuverlässigkeit und dem Fehlen von memory-Effekten noch zeitliche Vorteile: in einem Muffelofen können falls notwendig an einem Arbeitstag mehr als 70 Verbrennungen durchgeführt werden, eine Arbeitskraft kann in etwa 1,5 h 8 Proben in Oxydationsbomben einwiegen und diese verschließen. Die Verbrennung braucht nicht beaufsichtigt zu werden. Es können Verbrennungen auf Vorrat ausgeführt werden, was ein rationelleres Arbeiten ermöglicht.

Die erreichbaren analytischen Genauigkeiten zeigt folgende Testserie:

	% C ber.	% C gef.	% H ber.	% H gef.
Bernsteinsäure ...	40,68	40,60 40,68 40,43 40,48 40,58	5,12	5,00 4,99 5,07 5,18 5,06
Pentacetylglucose .	49,13	49,20	5,68	5,82
Phenanthren	94,34	94,26	5,66	5,61
N-Trifluoracetyl-phenyl-alanylserin-methylester	49,72	50,03	4,73	4,78
Chlorbenzoesäure	53,69	53,71	3,22	3,31
Sulfonal	36,82	36,99 36,61 36,78	7,06	7,12 7,07 6,85
Nitrobenzoesäure	50,31	50,27	3,02	3,02

Tabelle 2

Testanalysen von Kohlenstoff- und Wasserstoff-Gehalt durch Oxydation in Bombenrohren mit Kaliumperchlorat

²⁵⁾ R. C. Anderson, Y. Delabarre u. A. A. Bothner-By, *Analytic. Chem.* **24**, 1298 [1952].

²⁶⁾ K. E. Wilzbach u. W. Y. Sykes, *Science* [Washington] **120**, 3117 [1954].

^{26a)} Bei jodhaltigen Stoffen ist eine gleichzeitige Wasserstoff-Analyse nicht ohne weiteres möglich, da Jod in die Wasserfalle gerät.

²³⁾ Uni Z der Firma Prof. Berthold, Wildbad I. Schwarzwald.

²⁴⁾ Berelch, in dem der Anstieg 1,2%/100 V beträgt.

Die ^{14}C -Bestimmung

a) Bombenrohre

Die Bombenrohre werden aus Supremax-Glas angefertigt. Ihr äußerer Durchmesser soll 10–12 mm, die Wandstärke etwa 1 mm betragen. Man schneidet das Glasrohr in Stücke von 38 cm Länge und reinigt sie in Chromschwefelsäure. Vor einem Gebläse werden sie in der Mitte ungefähr 25 cm lang ausgezogen. Die Verengung wird mit einer kleinen Flamme so abgezogen, daß an jeder Hälfte ein etwa 3 cm langes Stück bleibt, das man zu einem sichelförmigen Haken biegt.

b) Einwaage der Substanz und Oxydation

Falls die Substanz nur aus Kohlenstoff, Wasserstoff und Sauerstoff besteht, kommt in die Bombe fein gepulvertes und getrocknetes Kaliumperchlorat p. a. (80 mg/10 mg Substanz). Anschließend wird die Substanz (3–60 mg) mit einem langstieligen Wägetrögen eingewogen und möglichst weit in die Bombe hineingebracht. Die Bombe wird etwa 5 cm vom offenen Ende entfernt stark verengt und über einen Hahn auf 0,1 Torr evakuiert. Besteht dabei die Gefahr des Verstäubens, so schiebt man etwas ausgeglühte Quarzwolle in die Bombe. Sie wird mit verschlossenem Hahn abgenommen, an der vorher verengten Stelle abgeschmolzen und in einer Schutzröhre in einem Muffelofen 40 min auf 650 °C erhitzt.

Flüchtige Substanzen werden in kleine Ampullen eingewogen, die man mit einer kleinen Krümmung verschließt, damit sie sich in der verschlossenen Bombe leicht durch Schütteln zerschlagen lassen. Die Bomben dürfen nicht erhitzt werden, bevor die Ampullen wieder geöffnet wurden, da die Druckwelle, die beim Sprengen der Ampulle durch Erhitzen entsteht, die Bomben meist zerstört.

Enthält die zu analysierende Substanz Stickstoff, Halogen oder Schwefel, so bringt man außer Kaliumperchlorat noch 20–30 mg feines Kupferoxyd in die Bombe.

c) Apparatur zur Füllung des Zählrohres

Die zu öffnende Bombe befindet sich in K (Abb. 1), dessen unterer Teil (30–35 cm Länge, innerer Durchmesser 2–3 mm weiter als der äußere Bombendurchmesser) einschließlich des Kernschliffes aus Quarzglas besteht. M2 ist ein Zwei-Flüssigkeits-Manometer^{26, 27}, das durch den Hahn HW3 mit hochgereinigtem Quecksilber und Tetraäthylenglykol-dibutyläther gefüllt wird. Nach dem Evakuieren der Apparatur soll das Quecksilber die Erweiterungen E1 und E2 (innerer Durchmesser 30 mm) etwa zur Hälfte, der Tetraäthylenglykol-dibutyläther die Kapillare (innerer Durchmesser 1,5–2 mm) 3–5 cm hoch füllen. Nach der ersten Füllung ist es nötig, das Manometer über HW1 und HW3 10 bis 20 Stunden zu evakuieren. Häufiges Klopfen gegen das Manometerrohr beschleunigt das Entweichen der Luft. F1 ist die Falle für die Kondensation des Wassers. Wird auf die Bestimmung des Wassers verzichtet, so kann ein mit P_2O_5 auf Glaswolle gefülltes U-Rohr verwendet werden. In F2 wird das Kohlendioxyd ausgefroren. Durch das senkrecht absteigende Rohr schiebt man einen kleinen Quarzwolleschlauch bis an die tiefste Stelle der Fallen, der das Verstäuben von kleinen Eis- bzw. Kohlendioxyd-Kristallen verhindert. Das Kohlendioxyd wird mit Hilfe des quecksilbergefüllten Manometers M1 gemessen. Bei der von uns verwendeten Apparatur ist das Meßvolumen bei geschlossenem H9 20 ml, bei geöffnetem H9 und geschlossenem H8 und H10 60 ml. A1, A3 und A7 führen zur Vakuumpumpe. An A1, A5 und A8 sind Vakuummeßröhren angeschlossen. Af ist eine Einschleußvorrichtung zum Auffüllen der Zählrohre mit nichtradioaktivem Gas.

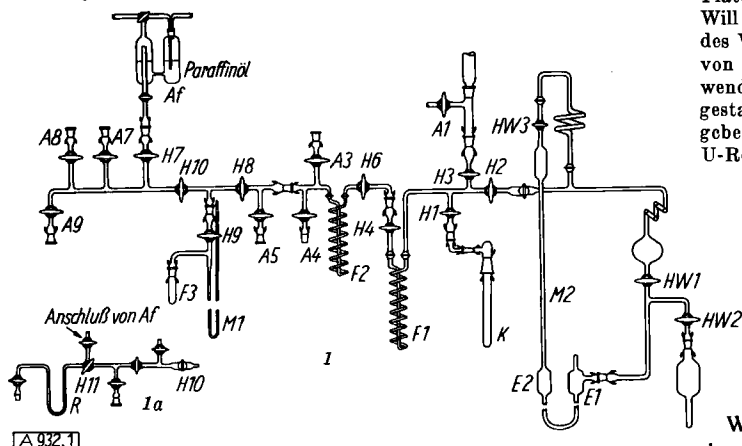


Abb. 1 und 1a. Vakuumapparatur zur manometrischen Bestimmung von Kohlendioxyd und Wasserdampf sowie zur Füllung von Gaszählrohren zur ^{14}C -Bestimmung

²⁷⁾ J. J. Naughton u. M. M. Prodyra, *Analytic. Chem.* 22, 711 [1950]; W. Schöniger, *Helv. chim. Acta* 49, 650 [1956].

Alle Hähne sind eingeschlifene Beutelhähne. (Eine etwas andere Ausführung der Apparatur siehe unter e).

d) Abfüllen einer Probe und Messung des Kohlendioxyds und Wasserdampfs

Die zu öffnende Bombe wird mit ihrer leicht brechbaren Spitze nach oben in K eingestellt, die gesamte Apparatur auf 10^{-2} bis $3 \cdot 10^{-2}$ Torr evakuiert, F1 mit Chloroform-Kohlensäure und F2 mit flüssiger Luft gekühlt. A1, H1, H2, H3, A4, A5 und H8 sind geschlossen, H4 und H6 stehen auf Durchgang. Durch Drehen von K um 180° wird die Spitze der Bombe gebrochen. H1 wird geöffnet. Nach 2–3 min herrscht, bei A5 gemessen, wieder das Ausgangsvakuum. Jetzt wird H3 geöffnet und gewartet, bis auch vor den Fallen das ursprüngliche Vakuum wieder erreicht ist. Meist dauert dies weitere 1–2 min. Sodann werden H4, H6 und A3 geschlossen. Falls die Bombe Kupferoxyd enthält, wird über K ein kleiner Ofen geschoben, der auf 380 °C erhitzt ist, um das Wasser aus evtl. gebildeten Kupfersalz-Hydraten auszutreiben. Die Kühlung von F2 wird entfernt und das CO_2 in F3 kondensiert. Die quantitative Überführung kann mit der Vakuummeßröhre an A5 überprüft werden. Das CO_2 läßt man in ein Volumen expandieren, das durch Öffnen oder Schließen von H9 passend gewählt wird. Jetzt wird der Ofen von K entfernt, der Stand von M2 abgelesen, H1 und H3 geschlossen, H2 geöffnet und die Kühlung von F1 entfernt. Nachdem die beiden Manometerstände wieder konstant geworden sind, werden sie abgelesen und daraus der Kohlenstoff- und Wasserstoff-Gehalt berechnet. Unter HW2 kann das Wasser erneut ausgefroren werden, wenn eine Deuteriumanalyse durchgeführt werden soll. Vom Einbringen der Bombe bis zur Berechnung der Ergebnisse (Rechenmaschine) werden 14–16 min benötigt.

Die Kohlendioxydmenge läßt sich nach folgender Formel berechnen (da die Volumeneichung mit Kohlendioxyd erfolgte, kann das ideale Gasgesetz verwendet werden):

$$\text{mMol CO}_2 = \frac{p \cdot (V + r^2 \pi) \cdot T_0}{p_0 \cdot V_0 \cdot T} = \frac{p \cdot (V + r^2 \pi) \cdot 273,16}{760,0 \cdot V_0 \cdot T} = \frac{\text{const.} \cdot p(V + r^2 \pi)}{T}$$

$$\% \text{ C} = \frac{\text{mMol CO}_2 \cdot 12,01 \cdot 100}{\text{Einwaage}}$$

Dabei ist p der Druck; V das geeichte Volumen; r der Radius des Manometers; l die Verschiebung des Manometerschenkels, der mit der Apparatur verbunden ist; T die absolute Temperatur, bei der der Druck des CO_2 gemessen wurde. Den Wasserstoff-Gehalt berechnet man nach der Formel:

$$\% \text{ H} = \frac{\text{Steighöhe} \cdot \text{Bezugstemperatur} \cdot 100 \cdot 0,1119}{(\text{Steighöhe/mg H}_2\text{O}) \cdot \text{Einwaage} \cdot \text{Arbeitstemperatur}}$$

$$\% \text{ H} = \frac{\text{const.} \cdot \text{Steighöhe}}{\text{Einwaage} \cdot \text{Arbeitstemp.}}$$

e) Füllung des Gaszählrohres

Das radioaktive CO_2 wird jetzt in die Ausfrieretasche des evakuierten Zählrohres, das an A9 angeschlossen ist, überführt. Anschließend wird über Af aus einer Stahlflasche eine Mischung von Äthan und CO_2 (3:7) durch eine Waschflasche mit konz. Schwefelsäure zu dem bereits im Zählrohr befindlichen radioaktiven Kohlendioxyd hinzukondensiert, bis der gewünschte Fülldruck erreicht ist. Wir arbeiten meist mit einem Druck von 500 mm Hg. Bei der von uns verwendeten Zählrohranordnung erreichen wir so eine Plateaulage von 3,6–4,0 kV. Die Zählrohre sind sofort meßbereit. Will man beim Abfüllen des Kohlendioxyds auf die Bestimmung des Wasserstoff-Gehaltes verzichten, so kann der in Abb. 1 rechts von H2 befindliche Teil der Apparatur wegfallen. Falls das verwendete Zählgerät es erlaubt, bei Atmosphärendruck zu arbeiten, gestaltet man die Apparatur links von H10 wie in Abb. 1a angegeben. Das Kohlendioxyd kann dann auch von F2 sofort in das U-Rohr R überführt werden. Nach Wegnahme der Kühlung wird über den Dreiweghahn H11 Äthan eingeschleußt und dadurch das radioaktive Kohlendioxyd durch A9 (kein Beutelhahn, sondern Vollstopfen) in das Zählrohr überführt und dieses gleichzeitig auf Atmosphärendruck gefüllt. Bei dieser Arbeitsweise darf das Zählrohr keine seitliche Ausfrieretasche haben. In diesem Falle kann auch mit Methan aufgefüllt werden.

Bestimmung der Radioaktivität tritium-markierter Verbindungen

Während das langlebige Radioisotop des Kohlenstoffs, das Nuklid ^{14}C , in der organischen Chemie und Biochemie schon zur Bearbeitung einer großen Zahl von Problemen benutzt wurde, hat das Radioisotop des Wasserstoffs bis vor kurzem nur selten Verwendung gefunden. Dies

ist um so erstaunlicher, als Tritium viel billiger ist als ^{14}C (z. Zt. etwa ein Hundertstel bis ein Tausendstel; s. Tabelle 3) und sich eine Substanz häufig leichter mit Tritium als mit dem Kohlenstoff-Isotop markieren läßt. Der Grund für die seltenere Anwendung dürfte in der schwierigen Analyse liegen. Verfügt man jedoch über eine brauchbare Analysenmethode, so sollten tritium-markierte Verbindungen in der Verdünnungsanalyse oder bei Studien über die Verteilung oder Biosynthese von Stoffen in Pflanzen und Tieren ^{14}C -markierten Verbindungen mitunter überlegen sein.

Kohlenstoff-14	Tritium
Maximalenergien der β -Strahlung	
0,158 MeV	0,018 MeV
Dosisleistung eines mC, das gleichmäßig im Körper eines 70 kg schweren Menschen verteilt ist	
0,039 rep/Tag	0,0044 rep/Tag
Kosten pro mC	
\$ 28.— (in Form von BaCO_3)	\$ 0,002 (als Gas)
Kosten von markierten Verbindungen, z. B. Leucin, pro mC	
\$ 800.—	\$ 35.—

Tabelle 3
Zusammenstellung einiger Zahlenwerte für ^{14}C und T^{15}

Bei der Tritium-Analyse sind zwei Schwierigkeiten prinzipieller Art zu berücksichtigen:

Durch den hohen Isotopieeffekt repräsentiert die Aktivität des Zählgases nur dann die Aktivität der zu analysierenden Substanz, wenn alle Reaktionen, die zur Erzeugung des Zählgases ausgeführt werden, vollständig verlaufen. Wie groß andernfalls der Fehler sein kann, mag folgendes Beispiel zeigen²⁸⁾: Nimmt man für eine Wasserstoff-Abspaltung aus einer tritium-markierten Verbindung einen nur mäßigen Isotopieeffekt von 2 an und läßt die Reaktion soweit laufen, daß nur $\frac{1}{100\,000}$ nicht reagiert, so ist die Radioaktivität des entstehenden Wasserstoffs immer noch um 0,3% zu klein.

Die zweite Schwierigkeit liegt in dem Auftreten von memory-Effekten, d. h. daß beispielsweise eine Apparatur, in der tritium-haltige Substanzen verbrannt wurden, bei der nächsten Verbrennung von nichtmarkiertem Material ein Zählgas liefert, das noch 5–20% der Radioaktivität der vorhergehenden Probe zeigt. Da sich die spezifischen Radioaktivitäten von Analysenproben häufig um mehrere Zehnerpotenzen unterscheiden, können bei Nichtbeachtung dieses Effektes leicht Fehler von mehreren hundert Prozent auftreten. Besonders ungünstige Bedingungen entstehen, wenn tritium-haltiger Wasserdampf mit Glasoberflächen zusammentrifft oder ^3H -enthaltende Paraffin-Kohlenwasserstoffe mit Fetten, wie sie zum Schmieren von Schliffen verwendet werden müssen. Beim Methan ist dieser Effekt noch vernachlässigbar, wird jedoch bei tritium-markiertem Butan, das *Glascocock*²¹⁾ als Zählgas verwendet, schon recht stark.

Da tritium-haltiger Wasserdampf neben einem hohen memory-Effekt in den Zählrohren auch bei geringen Partialdrücken sehr schlechte Plateaus ergibt, sind alle Verfahren, die Wasserdampf als Füllgas für die Zählrohre verwenden^{29–31)} für genaue Tritium-Bestimmungen ohne Bedeutung. Im Anschluß an die Verbrennung muß deshalb der im Wasser enthaltene Wasserstoff in ein geeignetes Zählgas überführt werden. Als solche kommen vor allem Wasserstoff im Gemisch mit Argon, Alkohol oder Methan oder aber tritium-markierte Kohlenwasserstoffe, die durch Umsetzung von H_2O mit Metallcarbiden oder Grignard-

Verbindungen erhalten werden, in Frage. Zur Reduktion von Wasser zu Wasserstoff ist eine Reihe von Verfahren angegeben worden¹⁵⁾. Am häufigsten dient Zink als Reduktionsmittel.

Zu Beginn unserer Bemühungen um eine genaue, rasche und einfache Tritium-Analyse im Mikromaßstab waren bereits die Verfahren von *Bernstein* und *Ballentine*³²⁾, *Verly*³³⁾, *Eidinoff*³⁴⁾, *Glascocock*²¹⁾ und *Wilzbach*^{8, 9)} bekannt. Von diesen ist das nach *Glascocock* jedoch recht umständlich. Die Substanzen werden in einem Rohr verbrannt und das gebildete Wasser in einem angeschlossenen, sehr komplizierten Vakuumsystem mit Butylmagnesiumhalogenid in Butan überführt. Etwa die Hälfte des Tritiums, verbleibt dabei im MgXOH und ist damit von der Messung ausgeschlossen; durch einen Isotopieeffekt könnte sich dieses Verhältnis noch verschlechtern. Der mittlere Fehler von $\pm 2\%$ ist gemessen am erforderlichen Aufwand recht hoch und stört insbesondere beim Arbeiten mit Isotopieeffekten. Ein weiterer Nachteil besteht im zweimaligen Auftreten des memory-Effektes durch Adsorption von Wasser an den Glaswänden und von Butan im Schliff-Fett. Vorteilhaft ist, daß für die Bestimmung von ^{14}C und ^3H nur eine Verbrennung benötigt wird.

Dem Verfahren von *Bernstein* und *Ballentine*³²⁾ haftet ebenfalls der Nachteil des memory-Effektes an. So zeigten Zählrohre, deren Füllung (tritium-haltiger Wasserstoff) 1 Std. mit einer Hochvakuumpumpe ausgepumpt worden war, immer noch bis zu 12% der ursprünglichen Aktivität. Diese Schwierigkeit sollte bei den von uns bereits zur ^{14}C -Analyse verwendeten Metallzählrohren nicht auftreten. Tatsächlich hatten Metallzählrohre, die mit tritium-haltigem Wasserstoff oder Methan (bis zu $7 \cdot 10^5$ ipm) gefüllt waren, nach zweimaligem Auspumpen für 3–5 min nie einen höheren memory-Effekt als 10^{-2} bis $10^{-3}\%$.

Bei den Verfahren von *Verly*³³⁾ und *Eidinoff*³⁴⁾ tritt ebenfalls der sehr lästige memory-Effekt in der Verbrennungsapparatur auf, so daß mehrere Bestimmungen ausgeführt werden müssen, um eine mittlere Genauigkeit von $\pm 2\%$ zu erreichen.

Am vorteilhaftesten schien uns das von *Wilzbach*⁸⁾ angegebene Verfahren zu sein, bei dem 5–10 mg organischer Substanz, zusammen mit 5–6 mg Wasser, 1 g Zink und 100 mg Nickeloxyd, in einer evakuierten Glasbombe mit leicht abbrechbarer Spitze 3 h auf 650°C erhitzt werden. Das Tritium der Probe fällt in einer Mischung von Wasserstoff und Methan an. Das Zählgas entsteht also in einer einzigen Reaktion. *Wilzbach* verwendete jedoch Ionisationskammern zur Messung der Radioaktivität, und es war fraglich, ob die Methode aus allen organischen Verbindungen ein für Proportionalzählrohre geeignetes Zählgas liefern würde, da bei Substanzen, die gleichzeitig Stickstoff und Halogen enthalten, eine beträchtliche Verminderung der Zählausbeute auftritt. Substanzen, die sowohl Tritium wie ^{14}C enthalten, lassen sich nach dieser Methode nicht analysieren.

Die Tritium-Analyse

Unsere ersten Versuche, nach der *Wilzbach*-Methode Zählgase für Proportionalzählrohre zu erhalten, schlugen fehl. Wie sich später herausstellte, ist ein spezieller Nickeloxyd-Katalysator notwendig, der uns zunächst nicht zugänglich war. Wir arbeiteten daher ein anderes Verfahren aus, das keinen memory-Effekt hat, insbesondere aber auch zur gleichzeitigen Bestimmung von ^{14}C und ^3H in doppelt markierten Verbindungen und zur Bestimmung des Tritium-Gehaltes von Substanzen, bei denen die *Wilzbach*-Methode in Kombination mit Proportionalzählrohren versagt, geeignet ist.

Die Substanz wird mit Kaliumperchlorat – bei halogenhaltigen und schwefelhaltigen Substanzen in Gegenwart einer geringen Menge Kupferoxyd – in eine Bombe eingewogen, diese anschließend 3 und 6 cm vom oberen Rand entfernt verengt, unter Vakuum an der äußeren Verengung abgeschmolzen und 40 min auf 650°C erhitzt. Nach dem Abkühlen wird die Bombe mit einem Ende 2–4 cm tief in flüssige Luft getaucht, um Wasser und Kohlendioxyd auszufrieren. Anschließend wird das CO_2 , während man die Bombe bei -70°C hält, herausgepumpt und entweder zur weiteren Verwendung in einer Falle ausgefroren oder verworfen. Dazu schließt man die geöffnete Bombe über einen kurzen Vakuumschlauch und einen Vakuumhahn an H 1 (Abb. 1) an und sublimiert das Kohlendioxyd nach F2. Nach

²⁸⁾ L. Melander: The Use of Nuclides in the Determination of Organic Reaction Mechanisms, University of Notre Dame Press, Notre Dame, Indiana 1955.

²⁹⁾ J. F. Cameron, Nature [London] 176, 1264 [1955].

³⁰⁾ E. B. Butler, ebenda 176, 1262 [1955].

³¹⁾ N. Pace, L. Kline, H. K. Schachman u. M. J. Harfenist, J. biol. Chemistry 168, 459 [1947].

³²⁾ W. Bernstein u. R. Ballentine, Rev. sci. Instruments 21, 158 [1950].

³³⁾ W. G. Verly u. Mitarb., J. Amer. Chem. Soc. 74, 5941 [1952].

³⁴⁾ M. L. Eidinoff, ebenda 69, 2504 [1947].

der Entfernung des CO_2 bringt man 1 g amalgamiertes Zink³⁵⁾ in die Bombe, verschließt sie an der zweiten Verengung wieder und erhitzt abermals 40 min auf 650 °C. Den Wasserstoff überführt man mit der in Abb. 2 gezeigten Apparatur in das Zählrohr.

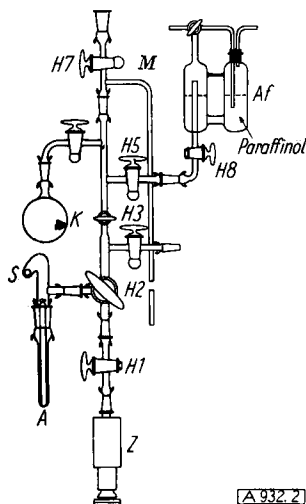


Abb. 2. Vakuumapparatur zur Füllung von Gaszählrohren oder Ionisationskammern mit Wasserstoff zur Tritium-Analyse

In A befindet sich die Bombe. An H2 ist über H1 ein Gaszählrohr (Z) oder eine Ionisationskammer angeschlossen. Das ganze System wird auf 10^{-2} Torr evakuiert, während durch H2 die Verbindung zwischen A, Z und der übrigen Apparatur hergestellt ist. Bei M befindet sich nicht gezeichnet eine Vakuummeßröhre. Danach wird H2 so gedreht, daß nur A und Z verbunden sind. H3 und H7 werden geschlossen und die Apparatur einschließlich des Kolbens K mit Methan oder Äthan durch Af auf Atmosphärendruck gebracht. Das einströmende Gas wird durch eine mit konz. Schwefelsäure gefüllte Gaswaschflasche geleitet, H8 und H5 bleiben geöffnet, während ein mäßiger Methanstrom fließt. Mit einem Magneten hebt man jetzt die Stahlkugel S an und läßt sie auf die leicht brechbare Spitze der Bombe fallen. Nachdem diese zertrümmert ist und man etwa 1 min gewartet hat, wird H2 so gedreht, daß A abgetrennt und die Verbindung zum oberen Teil der Apparatur hergestellt ist. Dadurch spült man den Wasserstoff, der sich zwischen H2 und Z befindet, in das Zählrohr und stellt Atmosphärendruck her. Die Plateaus der so gefüllten Zählrohre liegen meist zwischen 4,2 und 4,9 kV. Bis zur Konstanz müssen die Zählrohre etwa 15 min liegen. Die Zählausbeute beträgt 45–70 %.

Die in Tabelle 4 wiedergegebenen Beleganalysen zeigen die recht gute Genauigkeit dieses Verfahrens.

	ipm/ μMol		ipm/ μMol
Glucose-(1-T)	197,9	Glucosazon-(1-T)	195,0
	197,4		195,1
	198,2		195,7
Glucosazon-(1-T) *)	134,8	1-Desoxy-1-p-toluidino-fructose	189,6
	133,5		189,1

*) Die beiden Glucosazone stammen aus verschiedenen Reaktionen.

Tabelle 4
Analysenergebnisse nach der Kaliumperchlorat-Methode

Unsere Versuche zur *Wilzbach*-Methode führten uns zu dem Schluß, daß das Verfahren auf ganz speziellen Eigenschaften des verwendeten Nickeloxys beruht. Nachdem wir das Originalprodukt³⁶⁾ erhalten hatten, zeigte sich, daß die Methode im allgemeinen ausgezeichnete Resultate liefert. Die Werte werden zu klein und schwankend bei Substanzen mit prim. Aminogruppen und werden bei

³⁵⁾ Dazu wird der Zinkgrieß einige Minuten mit einer schwach schwefelsauren Quecksilber-II-chlorid-Lösung behandelt. Nach unseren Erfahrungen verhindert die Verwendung von amalgamiertem Zink, daß die Bomben mitunter noch Wasser enthalten.

³⁶⁾ Nickel-Oxide-Black Powder-Item 1-2792 der J. T. Baker Chemical Co., Phillipsburg, New Jersey. Nickelgehalt 77,0 %. Die Zusammensetzung liegt damit zwischen Ni_2O_3 und NiO .

Ammoniumsalzen ganz unbrauchbar. Tabelle 5 gibt einen Überblick über die erreichbaren Genauigkeiten. Einige Substanzen wurden zum Vergleich nach der Kaliumperchlorat-Methode analysiert (die Einwaagen betragen 3,5–11 mg).

	ipm/ μMol		ipm/ μMol
1-Desoxy-p-toluidino-D-fructose	1782	Trimethyläthylammoniumtetraphenylborat *)	295,5
	1776		296,1
	1767		298,3
	1768		296,2
	145,8		576,4
Glucosazon	145,3		577,8
	146,4		573,2 **)
Trimethyläthylammoniumtetraphenylborat *)	2088		368,2
	2093		369,5
	2085		367,0 **)
	2085 **)		

*) Verschiedene Präparate.

***) Nach der KClO_4 -Methode.

Tabelle 5

Analysenergebnisse nach der *Wilzbach*-Methode und Vergleich einiger Werte mit Ergebnissen nach der Kaliumperchlorat-Methode

Soweit aus der Literatur bekannt ist, wird diese Genauigkeit im allgemeinen nicht erreicht, was zum Teil darauf beruht, daß dort Zählrohre aus Glas verwendet werden, während wir solche aus Metall benutzten. So veröffentlichte *Christman*³⁷⁾ als unsere Arbeiten im Gange waren, einige Erfahrungen über die Verwendung des „*Wilzbach*-Gases“ in Proportionalzählrohren vom *Bernstein-Ballentine*-Typ. Es wird ein mittlerer Fehler der Einzelmessung von $\pm 1,9\%$ angegeben. Weiterhin wird betont, daß Spuren von Wasser, die in die Zählrohre gelangen, es schwierig oder unmöglich machen, diese wieder auf einen normalen Nulleffekt zu bringen. Wie groß die Schwankungen bei der *Wilzbach*-Methode sein können, wenn Substanzen mit primären Aminogruppen mit Hilfe von Proportionalzählrohren analysiert werden, haben wir an ^3H -markierter Glutaminsäure untersucht. Die Werte von sieben Bestimmungen weichen bis zu 10 % voneinander ab und sind im Mittel um 7 % zu klein. Dagegen unterscheiden sich zwei nach unserer Perchlorat-Methode erhaltene Werte nur um 0,2 %.

Anwendungsbeispiele

Zum Schluß sei noch auf ein Verfahren zur Bestimmung von aktivem Wasserstoff im Sinne der *Zerewitinoff*-Reaktion hingewiesen, das darauf beruht, daß Substanzen, die Wasserstoff an Sauerstoff, Stickstoff oder Schwefel gebunden haben, diesen in hydroxyl-haltigen Lösungsmitteln praktisch augenblicklich gegen Tritium austauschen³⁸⁾.

In Verbindung mit der Papierchromatographie leistet das gleiche Prinzip zur Bestimmung kleinster Substanzmengen wertvolle Dienste. Man eluiert dazu die Substanz mit 0,2–0,3 ml Wasser vom Chromatogramm in ein Quarzröhrchen und lyophilisiert das Eluat. Zum Rückstand gibt man einige Tropfen tritium-haltiges Wasser bekannter Aktivität, läßt stehen bis sich die Substanz gelöst hat und lyophilisiert abermals. Aus einer Tritium-Analyse des Rückstandes kann die Substanzmenge berechnet werden.

Herrn Prof. Dr. F. Weygand sind wir für seine stete Unterstützung zu großem Dank verpflichtet. Herrn G. Bießelski danken wir für sehr sorgfältige und geschickte Mitarbeit.

Eingegangen am 17. Dezember 1958 [A 932]

³⁷⁾ D. R. Christman, *Analyst* 46, (1), 5 [1957].

³⁸⁾ Vgl. z. B. F. Weygand u. H. Simon: Herstellung isotonenhaltiger organischer Verbindungen in Houben-Weyl: Methoden der organischen Chemie, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1954, Bd. 4/2 S. 679.