

ones. – S-shaped equilibrium curves were obtained with divalent metal cations and  $H^+$  as reference ion. The strong acid groups are more selective for the divalent cations, the weak ones for  $H^+$ .  $Fe^{3+}$  is fixed very selectively under acidic conditions, though it is taken up rather slowly. – The selectivity for  $Ni^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ , and  $Cu^{2+}$  with  $Ca^{2+}$  as reference ion increases strongly with increasing saturation of the exchanger with divalent cations, the remaining groups of the exchanger being in the  $H^+$ -form. Calculations showed much higher selectivity coefficients for the dibasic  $PO_4^{2-}$  than for the monobasic  $PO_4^-$  groups. Correspondingly a starch phosphate, the weak acid groups of which were partially esterified by diazomethane, was much less selective for divalent metal cations.

Agrikulturchemisches Institut  
der Eidg. Technischen Hochschule, Zürich

## 242. Eine Schnellmethode zur Bestimmung von Tritium, Radiokohlenstoff und Radioschwefel in beliebigem organischem Probenmaterial mittels des Flüssigkeits-Scintillations-Zählers

von F. Kalberer und J. Rutschmann

(28. IX. 61)

### 1. Einleitung

Für die Bestimmung der im Titel genannten schwachen  $\beta$ -Strahler, welche sowohl in der organischen Chemie wie auch für biologische Untersuchungen die am meisten verwendeten Radioisotope sind, gewinnt der Flüssigkeits-Scintillations-Zähler immer mehr an Bedeutung. Im Prinzip ist die Radioaktivitätsmessung sehr einfach, indem man die Substanz zusammen mit dem Scintillator löst und die Lösung zur Zählung bringt. Das für den Scintillationseffekt günstigste Lösungsmittel, Toluol, ist aber für viele Substanzen, insbesondere für Proben biologischen Materials, ungeeignet, und ausserdem wird die Zählhausbeute durch gefärbte Lösungen sowie durch quenchende und fluoreszierende Verbindungen in unterschiedlicher Weise beeinflusst. Das Löslichkeitsproblem und die Notwendigkeit, die Zählhausbeute der verschiedenartigen Messproben mittels radioaktiver Standardlösungen zu ermitteln, sind schwerwiegende Nachteile der Methode, insbesondere dann, wenn das Analysenmaterial sehr heterogen ist. Über die verschiedenen Versuche, diese Schwierigkeiten zu beheben, ist in zusammenfassenden Arbeiten berichtet worden<sup>1) 2)</sup>.

Eine wesentliche Voraussetzung für exakte Messungen der schwachen  $\beta$ -Strahler, insbesondere von Tritium, besteht darin, dass alle Proben eines bestimmten Isotops in derselben chemischen Form zur Zählung gelangen. Das wird am einfachsten durch eine Verbrennung erreicht, in welcher bei geeigneter Lenkung aus beliebigem Probenmaterial stets Wasser, Kohlendioxid bzw. Schwefeltrioxid als Endprodukte erhalten werden. Die bisher üblichen Verbrennungsmethoden für die Bestimmung

<sup>1)</sup> C. G. BELL & F. N. HAYES, Liquid Scintillation Counting, Pergamon Press, New York 1958.

<sup>2)</sup> J. D. DAVIDSON & P. FEIGELSON, Intern. J. appl. Radiation and Isotopes 2, 1 (1957).

der drei Isotope erfordern aber einen so bedeutenden apparativen und zeitlichen Aufwand, dass stets wieder Versuche unternommen worden sind, die Verbrennung zu umgehen, ohne jedoch zu voll befriedigenden Ergebnissen zu gelangen. Nachdem SCHÖNIGER<sup>3)</sup> für die Halogen- und Schwefelbestimmung die Kolbenverbrennung eingeführt hatte, wurde diese Methode von GÖTTE<sup>4)</sup> für die Analyse von <sup>14</sup>C-markierten Substanzen und von HABERSBERGEROVÁ-JENÍČKOVÁ<sup>5)</sup> für <sup>35</sup>S-Bestimmungen angewendet, wobei die Verbrennungsprodukte in Form von Bariumcarbonat bzw. Bariumsulfat isoliert und mit Zählrohren ausgezählt wurden. Um die Einfachheit und Schnelligkeit der Radioaktivitätsmessungen mittels flüssiger Scintillatoren voll ausnutzen zu können, wurde erst in allerjüngster Zeit wieder auf die rasche und sehr einfache Kolbenverbrennung für die Bestimmung schwacher  $\beta$ -Strahler zurückgegriffen<sup>6)</sup>. Wir berichten in der vorliegenden Arbeit über eine verbesserte, einheitliche Methodik, mit der alle <sup>3</sup>H-, <sup>14</sup>C- und <sup>35</sup>S-Bestimmungen, wie sie in einem chemischen oder biochemischen Laboratorium anfallen, rationell, genau und ohne Zuhilfenahme eines inneren Standards ausgeführt werden können.

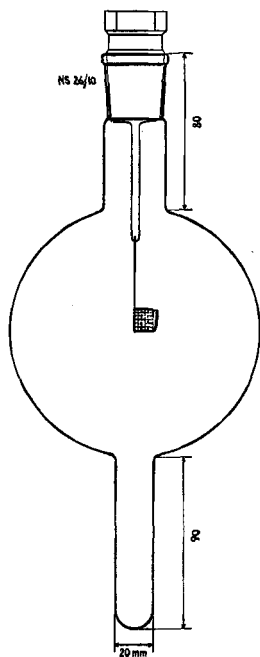


Fig. 1.

1-Liter-Verbrennungskolben  
mit zugehörigem Stopfen und  
Platinnetz

## 2. Experimentelles

**2.1. Apparatur.** – Für die Analyse wird ein Kolben verwendet, welcher gestattet, die Proben in Gegenwart des Absorptionsmittels zu verbrennen, so dass man vom Beginn der Verbrennung bis zur quantitativen Absorption der Verbrennungsprodukte im gasdicht verschlossenen System arbeitet. Der in Fig. 1 wiedergegebene Verbrennungskolben ermöglicht es, die methanolische Absorptionslösung während der Verbrennung in reinem Sauerstoff sozusagen aus dem Kolben herauszunehmen, indem die Lösung in einem Trockeneis-Aceton-Gemisch abgekühlt wird. Er ist aus gewöhnlichen, dickwandigen Pyrex-Rundkolben mit 26/10 Normalschliff hergestellt und hat gegenüber den meist verwendeten ERLÉNMEYER-Kolben den Vorteil, dass er gegen Druckänderungen viel widerstandsfähiger ist. Die Grösse des Verbrennungskolbens ist einerseits gegeben durch die maximale Menge Substanz, die verbrannt werden soll, und andererseits durch die Erfahrungstatsache, dass für einen guten Verbrennungsablauf nicht mehr als etwa 1/3 des vorhandenen Sauerstoffs verbraucht werden soll. Für die Verbrennung von bis zu 250 mg Substanz ist somit ein 1-Liter-Kolben die geeignete Grösse.

Die für die üblichen Kolbenverbrennungen benutzten Platinnetze haben wir leicht modifiziert, um eine grössere Sicherheit bei der Ausführung der Analyse zu erhalten. Das Platinnetz<sup>7)</sup> öffnet sich nach oben, wie aus Fig. 2d ersichtlich ist, und verhindert so ein Herausfallen der brennenden Probe.

<sup>3)</sup> W. SCHÖNIGER, *Microchim. Acta* 1955, 123; 1956, 869.

<sup>4)</sup> H. GÖTTE, R. KRETZ & H. BADDEHAUSEN, *Angew. Chem.* 69, 651 (1957).

<sup>5)</sup> A. HABERSBERGEROVÁ-JENÍČKOVÁ & J. ČÍFKA, *Collect. czechoslov. chem. Commun.* 24, 3777 (1959).

<sup>6)</sup> R. G. KELLY, E. A. PEETS, S. GORDON & D. A. BUYSKE, *Anal. Biochem.* 2, 267 (1961); J. F. EASTHAM, H. L. WESTBROOK & D. GONZALES, *Symposium on the Detection and Use of Tritium in the Physical and Biological Sciences*, Wien, Mai 1961.

<sup>7)</sup> Zu beziehen bei W. C. HERAEUS, G. m. b. H., Abt. Metalle, Hanau, Deutschland.

Mit zwei Standardpapieren<sup>8)</sup> als Substanzträger können sämtliche in Frage kommende Probenarten (vgl. 2.4) verbrannt werden. Für feste Proben wird das in Fig. 2a abgebildete Trägerpapier (ca. 130 mg) verwendet, Flüssigkeiten werden auf Filterschleim-Tabletten von 2 × 2 cm (ca. 200 mg, Fig. 2d) pipettiert. Die letzteren zeichnen sich durch ein grosses Saugvermögen aus und erlauben eine saubere Herstellung der zu verbrennenden Probe.

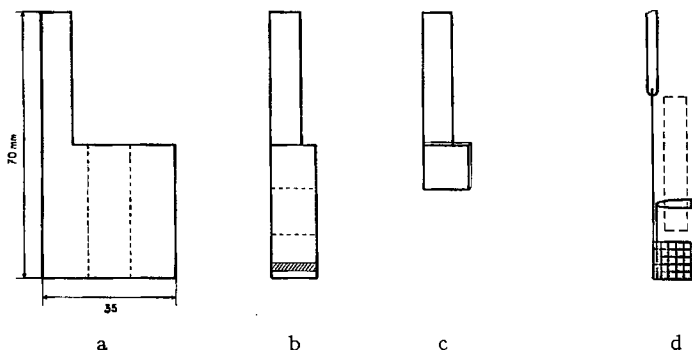


Fig. 2. Trägerpapiere und Probenzubereitung

Feste Substanzen werden auf das Trägerpapier (a) eingewogen und dann, wie durch die gestrichelten Linien angedeutet, zu einem Paket (c) zusammengefasst. Organe kommen in dem einmal gefalteten und unten mit einem Klebestreifen verschlossenen Papier (b) zur Trocknung.

Flüssigkeiten werden auf die im Platinnetz befestigten Filterschleim-Tabletten pipettiert und getrocknet. Vor der Verbrennung wird der Zündstreifen (mit gestrichelten Linien gezeichnet) in das zusammengefaltete Papier gesteckt (d).

**2.2. Absorptionslösung.** – Zur Messung von radioaktivem Kohlendioxid im Flüssigkeits-Scintillations-Zähler wurden bisher fast ausschliesslich Basen von relativ hohem Molekulargewicht verwendet (Hyaminhydroxid<sup>9)</sup>, Primene 81-R<sup>10)</sup>), da diese in Methanol-Toluol-Gemischen lösliche Carbonate bilden. Wir sind von der Forderung der Toluol-Löslichkeit des Carbonats abgegangen, da wir die gesamten Verbrennungsprodukte absorbieren und somit stets Wasser in der Absorptionslösung haben. Es zeigte sich, dass verschiedene niedermolekulare Amine, auch schwächerer Basizität, mit gutem Erfolg verwendet werden können, worunter das Äthanolamin<sup>11)</sup> infolge seines hohen Siedepunktes und des relativ kleinen Quencheffektes besonders gut geeignet ist. Die Konzentration der Base wird so gewählt, dass mit Sicherheit alle Verbrennungsprodukte absorbiert werden, ohne jedoch eine allzu starke Quenchung zu verursachen.

Als Lösungsvermittler für die im Toluol-Scintillator unlöslichen Verbrennungsprodukte wird Methanol verwendet, das gegenüber den manchmal verwendeten Äthern (Dioxan, Methylcellulose) den Vorteil hat, dass es stets in reiner Qualität erhältlich ist. Dioxan und Methylcellulose bilden bei längerem Stehen Peroxyde, die schon in geringen Konzentrationen die Zählbeute beträchtlich beeinflussen<sup>12)</sup>. Die Methanolmenge wird so bemessen, dass bei der Zähltemperatur von  $-5^{\circ}$  noch eine klare Lösung gebildet wird.

Als Absorptionslösung, die sich für <sup>14</sup>C- und <sup>35</sup>S-Bestimmungen aller Aktivitätsbereiche gleichermaßen eignet, wird ein Gemisch von 120 ml destilliertem Äthanolamin, das mit analysen-

<sup>8)</sup> Trägerpapiere aus quantitativem Filterpapier Nr. 589<sup>3</sup> und Filterschleim-Tabletten Nr. 292 sind in den angegebenen Dimensionen fertig zugeschnitten erhältlich bei SCHLEICHER & SCHUELL AG., Feldmeilen/Zürich.

<sup>9)</sup> J. M. PASSMANN, N. S. RADIN & J. A. D. COOPER, Anal. Chemistry 28, 484 (1956).

<sup>10)</sup> R. A. OPPERMANN, R. F. NYSTROM, W. O. NELSON & R. F. BROWN, Intern. J. appl. Radiation and Isotopes 7, 38 (1959).

<sup>11)</sup> H. JEFFAY & J. ALVAREZ, Anal. Chemistry 33, 612 (1961).

<sup>12)</sup> F. E. BUTLER, Anal. Chemistry 33, 409 (1961).

reinem Methanol auf 1000 ml verdünnt wird, verwendet. 15 ml dieser Lösung vermögen die Verbrennungsprodukte von 200 mg Substanz (inklusive Filterpapier) quantitativ zu absorbieren.

Für  $^3\text{H}$ -Bestimmungen wird als Absorptionslösung 10 ml analysenreines Methanol in den Verbrennungskolben vorgelegt.

Der Scintillator besteht aus einer Lösung von 4,0 g PPO (2,5-Diphenyloxazol) und 100 mg POPOP (1,4-Bis-[2-(5-phenyloxazolyl)]-benzol) in 1000 ml analysenreinem Toluol. Diese Scintillator-Lösung wird für  $^3\text{H}$ -,  $^{14}\text{C}$ - und  $^{35}\text{S}$ -Analysen benutzt.

**2.3. Sicherheitsmassnahmen.** – Um die Verbrennung gefahrlos ausführen zu können, müssen zwei Bedingungen erfüllt sein:

1. Während der Verbrennung muss die Zusammensetzung des Sauerstoff-Dampf-Gemisches im Kolben unterhalb der Explosionsgrenze liegen.

2. Mit der Absorption der Verbrennungsprodukte darf erst begonnen werden, wenn die Temperatur des Platinnetzes unterhalb der Zündtemperatur des zur Hauptsache aus Sauerstoff und Methanoldampf bestehenden Gemisches liegt.

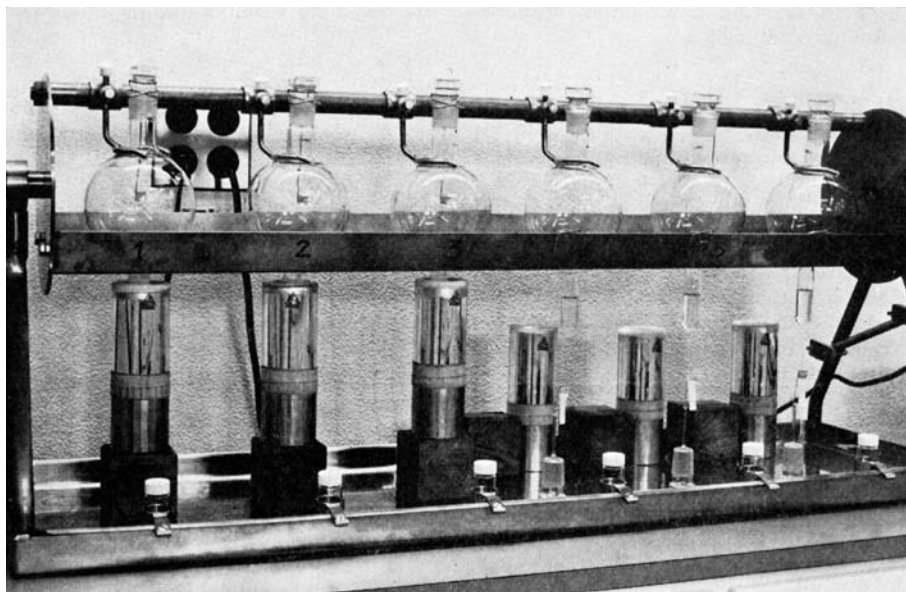


Fig. 3. *Verbrennungsapparatur für serienmässige  $^3\text{H}$ -,  $^{14}\text{C}$ - und  $^{35}\text{S}$ -Bestimmungen*

Die Verbrennungskolben sind mit Bügeln befestigt, die ein leichtes Auswechseln ermöglichen. Das Bild zeigt die Kolben 1–3 unmittelbar nach der Verbrennung. In den drei Kolben rechts ist das Absorptionsmittel vorgelegt. Nach dem Kühlen mit Trockeneis-Aceton werden die Kolben mit Sauerstoff gespült, worauf die in den Platinnetzen befestigten Proben zur Verbrennung kommen. Zur Absorption der Verbrennungsprodukte lässt man das Gestell, das rechts aussen von einem Elektromotor angetrieben wird, mit einer Geschwindigkeit von 60 Umdrehungen pro Minute rotieren. Im Vordergrund befinden sich die Zählfläschchen mit der Scintillatorlösung.

Die erste Forderung wird dadurch erfüllt, dass die Absorptionslösung im Zapfen des Verbrennungskolbens mit Trockeneis-Aceton gekühlt wird. Die untere Explosionsgrenze von Methanol-Sauerstoff-Gemischen liegt bei einem Gehalt von 6 Volumen-% Methanoldampf (20° und 760 Torr). Da der Dampfdruck des Methanols bei –44° nurmehr 1 Torr beträgt (für Äthanolamin ist der Dampfdruck bei dieser Temperatur noch geringer) und der Kolben, nachdem die Absorptionslösung sich auf –60° abgekühlt hat, mit Sauerstoff gespült wird, wobei die noch vorhandenen

Dämpfe ausgeblasen werden, liegt die Zusammensetzung des Gasgemisches während der Verbrennung weit unterhalb der Explosionsgrenze.

Während der Absorption erwärmt sich die Lösung auf Zimmertemperatur, so dass sich nun im Kolben ein entzündbares Gemisch bildet. Die Zündtemperatur von Methanol-Luft-Gemischen liegt bei 400°. Um eine Zündung zu vermeiden, lässt man das Platinnetz auf 20° abkühlen, bevor mit der Absorption begonnen wird, was zwei Minuten nach Beendigung der Verbrennung der Fall ist. Das Trockeneis-Aceton-Gemisch darf daher nicht vor Ablauf dieser Zeit vom Verbrennungskolben weggenommen werden. Für serienmässige Verbrennungen (Fig. 3) wird die Zeit nach Ausführung der letzten Verbrennung gestoppt.

Bei Verwendung der sich seitwärts öffnenden Platinnetze, wie sie für Kolbenverbrennungen benutzt werden<sup>3)</sup>, besteht bei grösseren Einwaagen oder bei zu loser Befestigung der Probe im Platinnetz die Gefahr, dass gegen Ende der Verbrennung ein Teil derselben in die Absorptionslösung fällt. Das Methanol entzündet sich hierbei und brennt dann mit kleiner, ruhiger Flamme während 2–3 Minuten weiter. In einem solchen Fall darf das Trockeneis erst nach dem Erlöschen der Flamme entfernt werden und der Stopfen soll, in üblicher Weise mit der Klammer befestigt, auf dem Kolben belassen werden. Die Verwendung der unter 2.1 vorgeschlagenen Platinnetze beugt solchen Gefahren vor.

Unter Einhaltung dieser einfachen Massnahmen haben wir ohne jeden Zwischenfall über 2500 Analysen ausgeführt.

**2.4. Probenvorbereitung.** – 2.4.1. *Reinsubstanzen kleiner spezifischer Aktivität ( $\mu\text{C}/\text{mMol}$ ):* Einige mg Substanz werden in einem Schiffchen abgewogen, auf das Filterpapier gebracht und das genaue Gewicht durch Zurückwägen bestimmt. Durch Zusammenfalten des Papiers wird die Substanz eingepackt und im Platinnetz, mit dem Zündstreifen gegen den Schliff, befestigt (Fig. 2a–c).

2.4.2. *Reinsubstanzen hoher spezifischer Aktivität ( $\text{mC}/\text{mMol}$ ):* Von der Substanz werden einige mg in einem 100-ml Messkolben in Methanol oder einem anderen geeigneten Lösungsmittel von nicht zu hohem Siedepunkt gelöst. Dann pipettiert man zwischen 0,1 und 0,4 ml dieser Lösung auf eine Filterschleim-Tablette, die man vorher, nach einmaligem Zusammenfalten, im Platinnetz befestigt hat, und trocknet hierauf unter einer Infrarot-Lampe oder im Trockenschrank. Bei Verwendung von 0,4 ml methanolischer Lösung beträgt die Trocknungszeit 10 Minuten. Bevor die Verbrennung ausgeführt wird, steckt man einen Zündstreifen aus quantitativem Filterpapier in die Probe, wie das in Fig. 2d angedeutet ist.

2.4.3. *Lösungen, Extrakte* werden auf Filterschleim-Tabletten pipettiert und getrocknet, wie unter 2.4.2 angegeben.

2.4.4. *Biologische Flüssigkeiten.* – 2.4.4.1. *Blut.* Zur Verhinderung der Gerinnung und um ein sauberes Abpipettieren zu ermöglichen, wird das Blut auf das Dreifache seines Volumens mit Wasser verdünnt, wobei man pro 10 ml Blut 0,5 ml 0,1-proz. wässrige Heparinlösung zusetzt. 0,4 ml hiervon wird auf eine Filterschleim-Tablette aufgetragen und getrocknet. Blut kann auch direkt ohne Verdünnung auf das im Platinnetz befestigte Papier aufgetropft und die aufgetropfte Menge durch Wägung bestimmt werden, worauf wie üblich getrocknet wird.

2.4.4.2. *Urin, Galle.* Nach eventueller Verdünnung mit Wasser werden 0,4 ml zur Analyse verwendet, dann wird wie unter 2.4.2 angegeben verfahren. Für wässrige Lösungen beträgt die Trocknungszeit bei einer Temperatur von 80° ca. 30 Min.

2.4.5. *Organe.* Das Filterpapier, welches auf dem Zündstreifen die Probenummer trägt, wird auf einem Kristallisierschälchen tariert, dann werden auf die Mitte des Papiers 100–250 mg frisches Organ eingewogen. Bei Einwaagen von mehr als 100 mg nimmt man mehrere kleine Stückchen, um eine leichtere Verbrennung zu erreichen und eine gute Durchschnittsprobe zu erhalten. Dann faltet man das Papier längs zusammen und verschliesst es unten mit einem schmalen Klebestreifen. Die so erhaltenen Papiersäckchen hängt man am Zündstreifen an einem mit Häkchen versehenen Gestell auf, das in einen Exsikkator passt, und trocknet über Nacht bei 20° im Vakuum (1/100 Torr) ohne Verwendung von Trockenmitteln. Die Organe kommen dann ohne nochmalige Wägung direkt zur Verbrennung; es ist nicht nötig, die Proben bis zur Gewichtskonstanz zu trocknen. Grössere Organstücke zerkleinert man nach dem Trocknen durch Zusammendrücken des Säckchens, faltet es dann zu einem Paket zusammen und befestigt es im Platinnetz (Fig. 2a–c).

Bei einem grossen momentanen Probenanfall können die Organe im evakuierten Exsikkator aufgehoben werden, bis sie zur Verbrennung kommen.

**2.4.6. Radio-Papierchromatogramme.** Kleine Streifen werden in das übliche Filterpapierstück eingepackt, grössere Streifen werden zusammen mit einem Zündpapier direkt im Platinnetz befestigt.

**2.4.7. Kohlendioxid aus Atmungsversuchen und Decarboxylierungsreaktionen.** Bei Untersuchungen über den Abbau  $^{14}\text{C}$ -markierter Verbindungen im tierischen Organismus wird die Ausatemungsluft zur Entfernung der Feuchtigkeit durch einen mit Calciumchlorid gefüllten Trockenturm und anschliessend durch zwei mit einer Glasfritte versehene Gaswaschflaschen geleitet, welche die methanolische Äthanolaminlösung (vgl. 2.2) enthalten. Entsprechend wird bei Decarboxylierungsreaktionen das Kohlendioxid mit einem Stickstoffstrom aus dem Reaktionsgefäss entfernt und in der Äthanolaminlösung absorbiert. Um ein Verdampfen des Methanols im Gasstrom zu verhindern, werden die Gaswaschflaschen gekühlt. Ein aliquoter Teil der Absorptionslösung wird zur Zählung verwendet.

**2.5. Verbrennung.** – Für  $^{14}\text{C}$ - und  $^{35}\text{S}$ -Bestimmungen werden 15 ml methanolische Äthanolaminlösung, für  $^3\text{H}$ -Analysen 10 ml Methanol in den an den Kolben angeschmolzenen Zapfen pipettiert. Hierauf taucht man den Zapfen in ein mit Trockeneis-Aceton gefülltes DEWAR-Gefäss ein, wartet drei Minuten, in welcher Zeit sich die Absorptionslösung auf  $-60^\circ$  abkühlt, und bläst dann den Kolben während 1 Minute mit Sauerstoff aus. Der Schliffstopfen, welcher die zu verbrennende Probe trägt, wird mittels eines nassen Wattebausches mit einem Wasserfilm überzogen, um einen gasdichten Verschluss des Kolbens zu sichern, dann zündet man den Streifen mit einem Zigarettenanzünder an, setzt den Stopfen sofort in den Schliff ein und befestigt ihn mit der Klammer. Nach der Verbrennung stoppt man mit der Uhr 2 Minuten, entfernt hierauf die DEWAR-Gefässe und lässt die Kolben zur Absorption der Verbrennungsprodukte während 20 Minuten rotieren (Fig. 3). Für Kohlenstoff- und Schwefel-Bestimmungen werden 10 ml Scintillator-Lösung in die Zählgläschen vorgelegt und 10 ml Absorptionslösung dazu pipettiert. Bei Tritium-Bestimmungen verwendet man 15 ml Scintillator-Lösung und 5 ml Absorptionslösung. Eine halbe Stunde, nachdem die Proben in den Probenwechsler eingesetzt sind, kann mit der Zählung begonnen werden.

### 3. Ergebnisse

**3.1. Messbedingungen.** – Die Messungen wurden mit dem TRI-CARB-Flüssigkeits-Scintillations-Spektrometer, Modell 314-AX (PACKARD Instrument Co., La Grange, Ill., USA) bei  $-5^\circ$  ausgeführt.  $^{14}\text{C}$ - und  $^{35}\text{S}$ -Lösungen werden bei 1150 Volt und der Diskriminator-Einstellung 10–70 (roter Scaler) und 70–100 (grüner Scaler) gemessen. Die Tritium-Bestimmungen erfolgen bei 1300 Volt mit derselben Diskriminator-Einstellung. Die folgenden Zahlenangaben beziehen sich auf die im roten Scaler registrierten Impulse. Der Blindwert beträgt 45–50 ipm<sup>13)</sup>, unabhängig davon, ob 100 oder 200 mg Substanz verbrannt werden und ob die Messung bei  $^3\text{H}$ - oder  $^{14}\text{C}$ -Bedingungen erfolgt. Die Zählhausbeuten für  $^3\text{H}$  und  $^{14}\text{C}$  wurden mittels geeichter, von PACKARD bezogener Standardlösungen ermittelt. Sie betragen für Tritium 7% und für Radiokohlenstoff 40% der absoluten Aktivität. Zur Ermittlung der Zählhausbeute für Radioschwefel stand kein Eichpräparat zur Verfügung. Da sich aber die von  $^{35}\text{S}$  emittierte  $\beta$ -Strahlung nur geringfügig von derjenigen des Radiokohlenstoffs unterscheidet, kann die Zählhausbeute ebenfalls mit 40% angenommen werden.

**3.2. Analyse von Reinsubstanzen.** – Um festzustellen, ob bei verschiedenen Mengen an inaktivem Trägermaterial zwischen der gemessenen und der absoluten Aktivität Proportionalität besteht, wurden verschiedene Proben von 1 bis 10 mg einer radioaktiven Substanz zusammen mit 130 bzw. 200 mg Papier verbrannt. Als Testsubstanzen wurden [ $^3\text{H}$ ]-Nitrobenzoesäure-methylester, [ $^{14}\text{C}$ ]-Benzoessäure und [ $^{35}\text{S}$ ]-3-Äthylmercapto-10-{3'-[1"-methylpiperazyl-(4"-)]-propyl(-1')}-phenothiazindimaleinat verwendet. Die Menge der vorgelegten Absorptionslösung und die Zusammensetzung der Zählösungen wurden so gewählt, wie unter 2.5 angegeben ist.

<sup>13)</sup> Impulse pro Minute.

Wie aus den Figuren 4, 5 und 6 ersichtlich ist, ergibt sich bei der Auftragung der gemessenen Aktivität gegen die für die Verbrennung verwendete Menge an radioaktiver Substanz sowohl für Tritium als auch für Radiokohlenstoff und Radio-schwefel eine durch den Nullpunkt gehende Gerade. Diese Linearität bedeutet, dass unter den gegebenen Versuchsbedingungen die Verbrennungsprodukte quantitativ absorbiert werden und die Zählausbeute konstant ist, unabhängig davon, ob 130 oder 200 mg Material verbrannt werden.

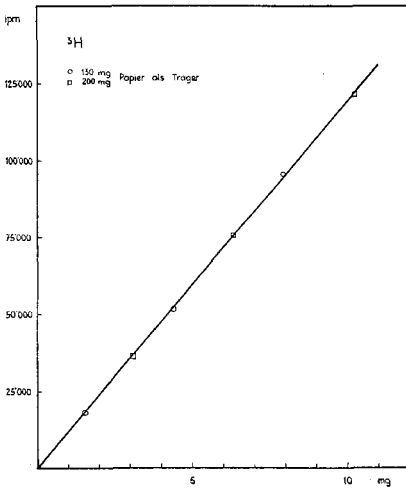


Fig. 4

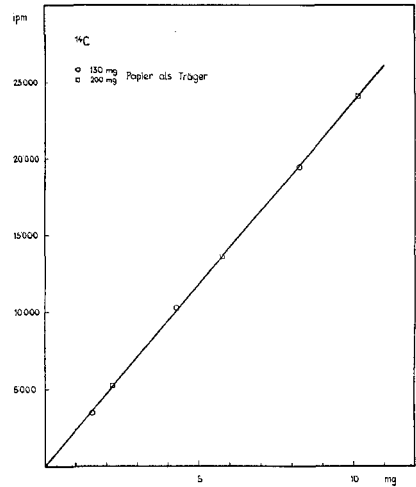


Fig. 5

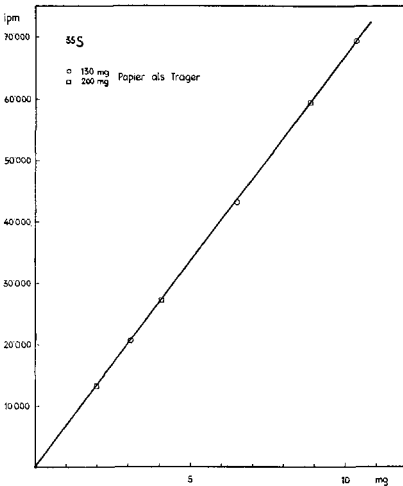


Fig. 6

Fig. 4-6. Proportionalität zwischen gemessener und absoluter Aktivität bei gleichzeitiger Verbrennung verschiedener Mengen von inaktivem Trägermaterial.

Fig. 4

$^3\text{H}$ -Bestimmung mittels Kolbenverbrennung

Fig. 5

$^{14}\text{C}$ -Bestimmung mittels Kolbenverbrennung

Fig. 6

$^{35}\text{S}$ -Bestimmung mittels Kolbenverbrennung

In weiteren Versuchen wurden Mengen zwischen 0,05 und 0,5 ml einer Lösung, welche pro ml 10  $\gamma$  einer  $^{14}\text{C}$ -markierten Verbindung enthielt, auf übliche Weise verbrannt. Auch in diesem Fall wird strenge Linearität festgestellt. Die bei der

Direktmessung verdünnter Lösungen manchmal auftretenden Zählverluste, die durch Adsorption der radioaktiven Verbindung an der Glaswand des Zählfläschchens verursacht werden können<sup>14)</sup>, werden bei der Verbrennung vermieden, da stets relativ grosse Mengen an CO<sub>2</sub> bzw. H<sub>2</sub>O aus dem inaktivem Trägermaterial entstehen. Für die Bestimmung verdünnter Lösungen von <sup>35</sup>S-markierten Substanzen empfiehlt es sich, eine inaktive Schwefelverbindung mit zu verbrennen.

Die Verbrennung eignet sich auch für eine präzise und quantitative Auswertung von Radiochromatogrammen. Bei Direktzählung der Streifen<sup>2)</sup> wird die Genauigkeit der Messung durch verschiedene Dicke des Papiers, unterschiedliche Löslichkeit der Substanzen in der Scintillator-Lösung und eventuelle Quencheffekte beeinträchtigt.

Die Reproduzierbarkeit und Genauigkeit der Methode für <sup>3</sup>H-, <sup>14</sup>C- und <sup>35</sup>S-markierte Verbindungen ist aus den in den Tabellen 1 und 2 aufgeführten Werten ersichtlich.

Tabelle 1. *Reproduzierbarkeit von <sup>3</sup>H-, <sup>14</sup>C- und <sup>35</sup>S-Bestimmungen mittels der Kolbenverbrennungsmethode*

[ <sup>3</sup> H]-Nitrobenzoesäure-methylester	[ <sup>14</sup> C]-Benzoesäure	[ <sup>35</sup> S]-3-Äthylmercapto-10-{3'-[1"-methylpiperazyl-(4'')]-propyl-(1')}-phenothiazin-dimaleinat
12030	23830	6514
11887	23696	6447
11783	23801	6499
11768	23467	6532
11950	23847	6523
12146	23500	6574
<u>11927 ± 60</u> ipm/mg*)	<u>23690 ± 69</u> ipm/mg	<u>6515 ± 17</u> ipm/mg

\*) Es ist der mittlere Fehler des Mittelwertes angegeben.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Bestimmung der drei Isotope vom Submilligramm- bis zum Halbmikro-Bereich nach derselben Methode ausgeführt werden kann. Wenn das Gewicht der zu verbrennenden Probe inklusive Trägerpapier im Bereich zwischen 130 und 200 mg liegt, was bei Verwendung der beiden Standardpapiere leicht eingehalten werden kann, und wenn routinemässig stets dieselben Mengen an Absorptions- und Scintillations-Lösung verwendet werden, dann ist die Zählhausbeute für beliebige Proben desselben Isotops konstant. Dadurch wird eine sehr einfache Auswertung der Messresultate erreicht, indem durch Multiplikation der gemessenen Nettoaktivität mit einem konstanten Faktor die absolute Aktivität erhalten wird, wodurch alle Messungen miteinander vergleichbar werden. In den Faktor gehen die Zählhausbeute und der Anteil der Absorptionslösung, der zur Messung benutzt wurde, ein. Die Verwendung eines inneren Standards erübrigt sich.

<sup>14)</sup> F. A. BLANCHARD & I. T. TAKAHASHI, Anal. Chemistry 33, 975 (1961).



Tabelle 2. Analysen von  $^3\text{H}$ -,  $^{14}\text{C}$ - und  $^{35}\text{S}$ -markierten Verbindungen mittels der Kolbenverbrennungsmethode (B), im Vergleich zur Direktzählung oder Messung im Proportional-Gaszählrohr (A)

Präparat*)	Spezifische Aktivität in mC/mMol	
	A**)	B***)
$^3\text{H}$ ]-Lysergsäure-diäthylamid (Delysid®) . . . . .	188,0	192,3
$^3\text{H}$ ]-3-Nitrobenzoesäure-methylester . . . . .	14,7	14,5
$^{14}\text{C}$ ]-Psilocin . . . . .	1,60	1,59
$^{14}\text{C}$ ]-Pikropodophyllinsäure-hydrazid . . . . .	0,520	0,522
$^{14}\text{C}$ ]-Podophyllotoxin-benzyliden- $\beta$ -D-glucosid . . . . .	0,910	0,898
$^{14}\text{C}$ ]-1-[N-Methylpiperidyl-(4')]-3-phenyl-4-benzyl-pyrazol-5-on .	0,734	0,725
$^{14}\text{C}$ ]-1-[N-Methylpiperidyl-(4')]-3-phenyl-4-äthyl-pyrazol-5-on .	0,700	0,700
$^{14}\text{C}$ ]-Spiro-[1'-methylpiperidyl-(4')]-N-äthylsuccinimid- hydrobromid . . . . .	1,13	1,13
$^{14}\text{C}$ ]-Tosyl-methylamid . . . . .	$0,360 \cdot 10^{-3}$	$0,365 \cdot 10^{-3}$
$^{14}\text{C}$ ]-Benzoesäure . . . . .	$3,18 \cdot 10^{-3}$	$3,22 \cdot 10^{-3}$
$^{14}\text{C}$ ]-Benzoesäure . . . . .	$4,25 \cdot 10^{-6}$	$4,24 \cdot 10^{-6}$
$^{35}\text{S}$ ]-3-Äthylmercapto-10-{3'-[1''-methylpiperazyl-(4'')]-propyl- (1')}-phenothiazin-dimaleinat (Torecan®) . . . . .	1,61	1,61
$^{35}\text{S}$ ]-3-Methylmercapto-10-{2'-[1''-methylpiperidyl-(2'')]-äthyl- (1')}-phenothiazin-hydrochlorid (Melleril®) . . . . .	$15,5 \cdot 10^{-3}$	$15,6 \cdot 10^{-3}$

\*) Sämtliche Präparate wurden in unserem Laboratorium synthetisiert.  
 \*\*) Die  $^{14}\text{C}$ -Verbindungen wurden als  $^{14}\text{CO}_2$  im Proportional-Gaszählrohr gezählt<sup>15)</sup>. Die Aktivität der Tritium-Verbindungen wurde durch Direktzählung und Vergleich mit dem von PACKARD bezogenen Tritium-Standard bestimmt. Ebenfalls durch Direktzählung und Vergleich mit dem  $^{14}\text{C}$ -Standard wurde die Aktivität der  $^{35}\text{S}$ -Verbindungen ermittelt. Die Werte sind auf  $\pm 1\%$  genau.  
 \*\*\*) Die stark aktiven Präparate (mC/mMol) wurden nach dem unter 2.4.2, die schwach aktiven nach dem unter 2.4.1 beschriebenen Verfahren bestimmt. Es ist der Mittelwert aus 3 Analysen angegeben, die Abweichungen der Einzelwerte vom angegebenen Mittelwert betragen ca. 1%. Sämtliche Werte wurden ohne Benutzung eines inneren Standards ermittelt.

**3.3. Analyse von biologischem Material.** – Die Bestimmung radioaktiv markierter Substanzen in Organen und biologischen Flüssigkeiten wurde folgendermassen geprüft:

**3.3.1. Homogenat.** Zu dem in einem POTTER-Apparat hergestellten Muskelhomogenat wurde eine wässrige Lösung von  $^{14}\text{C}$ ]-1-[N-Methylpiperidyl-(4')]-3-phenyl-4-benzyl-pyrazol-5-on gegeben und hierauf gefriertrocknet. Von dem so erhaltenen Gewebepulver wurden jeweils 20 mg pro Bestimmung verbrannt.

**3.3.2. Nicht homogenisiertes Organ.** Eine Ratte wurde eine bestimmte Zeit nach Injektion einer  $^{14}\text{C}$ -markierten Verbindung getötet; von der Leber wurden Stücke zwischen 100 und 200 mg entnommen und, wie unter 2.4.5 angegeben, getrocknet und anschliessend verbrannt.

**3.3.3. Blut.** 3 ml heparinisiertes Blut werden mit Wasser und einer wässrigen  $^{14}\text{C}$ ]-Psilocin-Lösung auf 10 ml verdünnt, um eine gut pipettierbare Lösung zu erhalten. Je 0,4 ml werden auf eine Filterschleim-Tablette gebracht und nach dem Trocknen verbrannt.

**3.3.4. Urin.** 5 ml Urin werden mit Wasser und einer wässrigen  $^{14}\text{C}$ ]-Psilocin-Lösung auf 10 ml verdünnt und pro Verbrennung 0,4 ml dieser Lösung verwendet.

<sup>15)</sup> J. RUTSCHMANN & W. SCHÖNIGER, Helv. 40, 428 (1957); J. RUTSCHMANN, Helv. 40, 433 (1957).

Die Resultate dieser Bestimmungen sind in Tabelle 3 zusammengefasst. Sie zeigen eine gute Übereinstimmung zwischen berechneter und gefundener Aktivität. Die in Kolonne 2 aufgeführten Zahlen zeigen ausserdem, dass die hier angegebene Methode für die Analyse von Organen ebenso gut reproduzierbare Werte liefert wie sie bei der Bestimmung von Homogenaten erhalten werden, deren Herstellung einen beträchtlichen Mehraufwand an Zeit und Material erfordert.

Tabelle 3.  $^{14}\text{C}$ -Bestimmung in biologischem Probenmaterial durch Kolbenverbrennung ohne Verwendung eines inneren Standards

<i>Muskelhomogenat</i> Ber. 4820 dpm/mg	<i>Leber</i> Aktivität dpm/mg	<i>Blut</i> Ber. 32010 dpm/ml	<i>Urin</i> Ber. 32010 dpm/ml
Gef. 4733	Gef. 199	Gef. 31572	Gef. 32242
4820	199	32010	32290
4801	198	32178	32235
4691	207	32382	31835
4686	200	32058	31360
4735	200	32020	32020
$4744 \pm 23$ dpm/mg*)	$200 \pm 1,4$ dpm/mg	$32035 \pm 109$ dpm/ml	$31998 \pm 146$ dpm/ml
*) Es ist der mittlere Fehler des Mittelwertes angegeben, dpm = Desintegrationen pro Minute.			

Bei der Verbrennung von Organen bleibt stets etwas Russ auf dem Platinnetz zurück. Ein Zusammenhang zwischen der Menge an unverbranntem Kohlenstoff und der gemessenen Aktivität der Probe, der sich nur bei  $^{14}\text{C}$ -Bestimmungen bemerkbar machen könnte, ist nicht festzustellen. Die Russbildung ist bedingt durch die Asche der Organe. Bei der Verbrennung werden die gleichmässig über das ganze Organ verteilten Mineralsalze räumlich immer mehr konzentriert, so dass beim letzten Verglimmen der Probe auf einem Punkt des Platinnetzes eine Salzschnmelze entsteht, die stets etwas Kohlenstoff eingeschlossen enthält.

Die bei der Verbrennung von Organen entstehenden, beträchtlichen Mengen von Stickoxiden werden vollständig absorbiert. Die Absorptionslösungen sind auch bei der Analyse von Organproben völlig farblos, wie das bei allen anderen Verbrennungen der Fall ist.

3.4. *Memory-Effekt.* – Schliesslich wurden noch die Verbrennungskolben auf einen eventuellen Memory-Effekt untersucht. Nach der Verbrennung hochaktiver Präparate (Aktivität pro Verbrennung ca.  $10^7$  dpm) wurden die Kolben gut mit Wasser gespült, 1 Min. mit verdünnter Salzsäure geschüttelt, und, nach erneutem Spülen mit destilliertem Wasser, getrocknet. Bei  $^3\text{H}$ - und  $^{14}\text{C}$ -Bestimmungen sind die Verbrennungskolben nach diesem Reinigungsverfahren völlig frei von Radioaktivität. Dagegen zeigen die Kolben nach Verbrennung stark aktiver,  $^{35}\text{S}$ -markierter Verbindungen einen Memory-Effekt. Durch Behandlung mit Chromschwefelsäure werden sie ebenfalls frei von Radioaktivität erhalten.

Mit zwei Schüttelmaschinen von der in Figur 3 gezeigten Art lassen sich pro Tag über 100 Analysen ausführen, das Einwägen nicht inbegriffen.

Die Methode eignet sich auch zur Bestimmung anderer Radioisotope, welche flüchtige oder lösliche Verbrennungsprodukte bilden (z. B. Halogene u. a.). Über die Analyse doppelmarkierter Verbindungen werden wir demnächst berichten.

## SUMMARY

A detailed description is given of the determination of  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$  and  $^{35}\text{S}$  in any material by the oxygen flask method followed by liquid scintillation counting. Improved apparatus and simplified sample preparation enable the analyses to be carried out quickly. For all determinations of  $^{14}\text{C}$  and  $^{35}\text{S}$  only one absorption solution is used. The use of an internal standard is no longer necessary, as the counting efficiency for all samples of the same isotope is constant under standard conditions. The accuracy and reproducibility are at least as good as those for other analysis methods. Safety measures are indicated.

Biochemische Abteilung, SANDOZ, Basel

### 243. Action des halogénures d'alcoyles sur les anions anthracéniques Quelques nouveaux dérivés dihydroanthracéniques substitués

par R. Gerdil et E. A. C. Lucken

(28 IX 61)

**Introduction.** – La formation de composés d'addition entre certaines classes de molécules organiques non saturées et les métaux alcalins est connue depuis longtemps<sup>1)</sup>. La structure des complexes et la nature de la liaison entre le métal et la molécule organique ont fait l'objet de nombreux travaux<sup>2)</sup>. Les composés seraient dus au transfert d'un ou de deux électrons à partir du métal, la molécule organique jouant le rôle d'accepteur. Le transfert d'un électron produit un radical anion paramagnétique<sup>3)</sup>; le transfert de deux électrons donne naissance à un anion bivalent diamagnétique<sup>4)</sup>. L'hypothèse d'un transfert d'électron est en accord avec le mécanisme de la réduction électrolytique des hydrocarbures cycliques (potentiels de demi-onde) étudié par HOIJTINK *et al.*<sup>5)</sup> et tout récemment par POINTEAU<sup>6)</sup>.

Les composés d'addition s'obtiennent, sous forme de solutions très colorées, par action directe du métal sur la molécule organique, au sein d'un solvant dont la nature exerce une influence prépondérante sur la stabilité de l'anion formé (SCOTT *et al.*<sup>2)</sup>). Ces anions sont très sensibles à l'action de l'eau, de l'air et d'un assez grand nombre d'agents chimiques<sup>1)</sup> 7).

<sup>1)</sup> W. SCHLENK, J. APPENRODT, A. MICHAEL & A. THAL, Ber. deutsch. chem. Ges. *47*, 473 (1914).

<sup>2)</sup> N. D. SCOTT, J. F. WALKER & V. L. HANSLEY, J. Amer. chem. Soc. *58*, 2442 (1936); D. E. PAUL, D. LIPKIN & S. I. WEISSMANN, *ibid.* *78*, 116 (1956); W. A. HOLMES-WALKER & A. R. UBBELOHDE, J. chem. Soc. *1954*, 720.

<sup>3)</sup> D. LIPKIN, D. E. PAUL, J. TOWNSEND & S. I. WEISSMAN, Science *117*, 534 (1953).

<sup>4)</sup> TING LI CHU & SHAN CHI YU, J. Amer. chem. Soc. *76*, 3367 (1954).

<sup>5)</sup> G. J. HOIJTINK, J. VAN SCHOOTEN, E. DE BOER & W. IJ. AALBERSBERG, Rec. Trav. chim. Pays-Bas *73*, 355 (1954).

<sup>6)</sup> R. POINTEAU & MME FAVEDE, Communication, The Fifth International Symposium on Free Radicals, July 1961, Uppsala, Sweden.

<sup>7)</sup> C. S. RONDESTVEDT & I. NICHOLSON, J. org. Chemistry *20*, 346 (1955); P. BERÇOT, Ann. Chim. [3-4] *6*, 194 (1961).