

119. Komplexometrische Mikrobestimmung von Schwermetallen mit Kobalt-60 als radioaktivem Indikator

von A. Fuchs

(26. I. 66)

Einleitung. – E. SCHUMACHER [1] beschrieb 1958 eine Mikromethode zur quantitativen Analyse von Schwermetallen und Seltenen Erden (SE), die auf folgendem Prinzip beruht: Zur unbekanntem Menge des zu bestimmenden Metalls, das mit einem radioaktiven Isotop versetzt wurde, wird eine bekannte, unterschüssige Menge Komplexbildner gegeben. Das komplexierte Metall wird vom unkomplexierten abgetrennt, und aus den Zählraten von Komplex bzw. nicht komplexiertem Metall wird die unbekannte Metallmenge errechnet. Eine der Anwendungen der Methode ist die radioaktive Isotopenverdünnungsanalyse, indem durch die zugegebene, bekannte Menge Komplexbildner eine bekannte Menge des markierten Metall-Ions als Probe entnommen und zur Bestimmung der spezifischen Aktivität verwendet werden kann.

Voraussetzungen der Methode sind: Die Stöchiometrie der Komplexbildungsreaktion muss bekannt sein, die Komplexbildungskonstante muss zur Erreichung einer hohen Empfindlichkeit genügend gross sein, und die Trennung des komplexierten vom unkomplexierten Metall darf das Komplexbildungsgleichgewicht nicht stören.

Diese Voraussetzungen wurden von SCHUMACHER durch die Verwendung von Komplexonen als Komplexierungsmittel realisiert, wobei die Abtrennung des Komplexes durch Doppelfokussierung beim fokussierenden Ionentausch [1] oder durch Papierchromatographie [2] erfolgte. RUZICKA & STARY [3] arbeiten vorwiegend mit Komplexen, die mit organischen Lösungsmitteln extrahierbar sind.

In der vorliegenden Arbeit wird eine Methode beschrieben, die Äthylendiaminetetraacetat (EDTA) als Komplexierungsmittel verwendet und zur Abtrennung des Komplexes die Papierelektrophorese benützt. Diese hat den Vorteil, schnell und sauber zu arbeiten. Die Elektrophorese dauert 2 bis 3 Minuten, und die Kontaminierungsgefahr ist gering, da wenig Manipulationen mit radioaktiven Lösungen auszuführen sind. Die Empfindlichkeit ist sehr gross, was unter anderem durch die geringen Volumina (Grössenordnung μl) bedingt ist, die zur Elektrophorese eingesetzt werden können. Die papierelektrophoretische Methode ist in vielem der von SCHUMACHER [1] beschriebenen Trennung durch das theoretisch etwas schwerer verständliche Phänomen der Doppelfokussierung ähnlich.

Mikrobestimmung von Kobalt

Durchführung der Analyse: Ein gemessenes Volumen einer mit ^{60}Co (β, γ ; $T_{1/2} = 5,2$ a) markierten Co^{II} -Lösung wird mit einem bestimmten Volumen einer EDTA-Lösung von bekannter Molarität versetzt, deren pH zwischen 5 und 7 gehalten wird. Das Gemisch, dessen Volumen 10–100 μl betragen soll, wird auf einen 12 mm breiten Filterpapierstreifen (SCHLEICHER & SCHÜLL 4023) aufgetragen. Der Papierstreifen wird von einem Teflonbügel gehalten (vgl. Fig. 1) und hat

eine benützbar Länge von ca. 60 mm¹). Das Analysengut wird in der Mitte aufgetragen; die beiden Enden werden mit Elektrodenraumlösung getränkt. Die Elektrodenraumlösung wird so gewählt, dass sie eine wesentlich grössere Leitfähigkeit besitzt als die Analysenlösung und keine Ionen enthält, die in das Komplexbildungsgleichgewicht eingehen, wie z. B. 0,5 M NaNO₃-Lösung. An die Enden wird eine Spannung von bis zu 1800 V angelegt, was einer Feldstärke im Trennbereich von ca. 300 V cm⁻¹ entspricht. Es fliesst ein Strom von ca. 0,5 mA. Zur Kühlung taucht der Streifen in ein CCl₄-Bad. Nach 2 bis 3 Minuten ist eine Trennung des Kobalts vom Kobalt-EDTA-Komplex erreicht, wie Fig. 2 zeigt. Durch den grossen Unterschied in der ionalen Stärke und in der elektrischen Feldstärke zwischen Analysengut und Elektrodenraumlösung tritt eine Fokussierung auf. Nach Trocknen mit dem Föhn wird der Streifen beidseits mit einem Klebband bedeckt, in einige Abschnitte zerschnitten und diese ausgezählt. Wir verwenden einen Bohrloch-Scintillationszähler und zählen ca. 4000 Imp. aus, entsprechend einer Zähldauer von 0,5 Min. pro Abschnitt. Die Geometrie des Abschnitts innerhalb des Bohrlochs ist nicht kritisch.

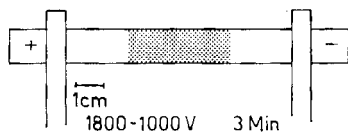


Fig. 1. Im schraffierten Bereich wird die Analysenlösung aufgetragen. Vgl. Text

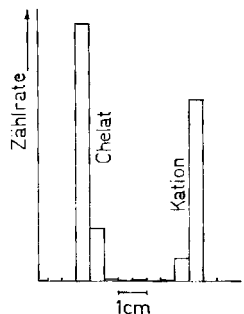


Fig. 2. Radioaktivitätsverteilung längs des Papierstreifens nach der Elektrophorese

Wenn wir den Quotienten aus der Zählrate des Kobaltkomplexonats dividiert durch die totale Zählrate des Streifens mit Q bezeichnen, erhalten wir für die gesuchte Kobaltmenge:

$$\begin{aligned} \text{Co} &= \text{EDTA} \cdot Q^{-1}, \text{ oder allgemein:} \\ M &= L \cdot Q^{-1} \quad (0 < Q < 1), \text{ wobei} \\ M &= \text{gesuchte Menge Metall (in Mol)} \\ L &= \text{eingesetzte Menge Komplexbildner (in Mol)}. \end{aligned} \quad (1)$$

Alle Bestimmungsmethoden, die auf dem eingangs beschriebenen Prinzip beruhen, haben einen systematischen Fehler. Gleichung (1) setzt voraus, dass der gesamte eingesetzte Komplexbildner L mit dem Metall M zum Komplex ML , mit der 1:1 Stöchiometrie, reagiert. Diese Voraussetzung ist, da die Komplexbildungskonstante K_{ML} nicht beliebig gross ist, nicht exakt erfüllt. Der dadurch entstehende Fehler F beträgt:

$$F = \frac{\alpha_H}{\alpha_H + [M]_t K_{ML} (1 - Q)}, \text{ mit} \quad (2)$$

α_H = Protonierungsfunktion des n -protonigen Liganden L ,
 $[M]_t$ = totale Konzentration des zu analysierenden Metall-Ions

¹) Für eine Beschreibung der von uns verwendeten Elektrophoreseapparatur s. [4], Fig. 1. Wir danken Herrn Professor E. SCHUMACHER für die freundliche Überlassung einer seiner Apparaturen und von Kobalt-60.

Ein weiterer systematischer Fehler tritt auf, wenn durch die Trennung von M und ML zur gesonderten Radioaktivitätsbestimmung das Komplexbildungsgleichgewicht gestört wird. Man könnte deshalb erwarten, dass die Dauer der Elektrophorese einen Einfluss auf das Resultat hätte. Es zeigte sich jedoch, dass bei gleicher Anfangsspannung und ungefährender Konstanthaltung der Leistung (leichte CCl_4 -Blasenbildung am Papier) eine Verlängerung der Trenndauer von 2 auf 6 Minuten bei sonst gleichen Bedingungen keine Änderung der Zählrate des Komplexonats-Fokus bewirkt (3466 resp. 3452 Imp.).

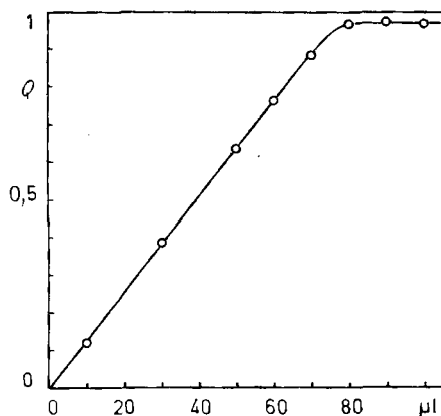


Fig. 3. Relative Radioaktivität Q des Kobaltkomplexonats-Fokus als Funktion der zugegebenen EDTA-Menge

Tabelle 1. Messdaten zu Fig. 3

Co-Lösung $5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ µl	EDTA-Lösung 10^{-5} M µl	Zählrate Kobaltkomplex ipm	Zählrate Kobalt plus Kobaltkomplex ipm	Q
je 16	10	1033	je 8587 (gemittelt)	0,121
	30	3327		0,388
	50	5488		0,638
	60	6589		0,767
	70	7600		0,886
	80	8316		0,969
	90	8362		0,975
	100	8323		0,970

Elektrodenraumlösung: $0,3 \text{ M NaNO}_3$. Analysenlösung: pH 6. Elektrophorese sofort nach der Kobaltzugabe mit der Anfangsspannung von 1800 V, unter ungefähr konstanter Leistung (0,5–1 mA, geringe Entwicklung von CCl_4 -Blasen am Papierstreifen). Dauer: 2,5 Min. Die Lösungen werden in Polyäthylenflaschen aufbewahrt und mit Polyäthylen-Mikropipetten abgemessen. Die EDTA-Lösung wurde auf 5% genau eingestellt; die Eichung der selbstverfertigten Pipetten erfolgte ebenfalls auf 5% genau. Die Steigung des Anfangsteils der Titrationskurve in Fig. 3 entspricht einer Konzentration der Kobaltlösung von $4,7 \cdot 10^{-5} \text{ M}$. Der Sollwert der radioaktiven Kobaltlösung ist $5 \cdot 10^{-5} \text{ M} \pm 10\%$. Die Stöchiometrie ist damit innerhalb der Fehlergrenzen erfüllt. Streuung der Methode, auf Kobalt bezogen: 0,26 ng (Standardabweichung).

Fig. 3 zeigt, dass die Beziehung (1) bis zu einem Titrationsgrad von 0,8 erfüllt ist. Darüber macht sich der systematische Fehler bemerkbar. Dieser ist, wie auf Grund von Gleichung (2) zu erwarten ist, abhängig vom pH, indem er mit sinkendem pH ansteigt. Die besten Arbeitsbedingungen erhält man mit einer Analysenlösung vom pH zwischen 5 und 7. Bei einem pH grösser als 7 wird der Kobaltfokus verbreitert und die Trennung vom Kobaltkomplex dadurch verschlechtert.

Mikrobestimmung anderer Schwermetalle. – Auf die im vorhergehenden Abschnitt beschriebene Weise lassen sich auch andere Metall-Ionen bestimmen, indem die entsprechenden isotopen Indikatoren verwendet werden. Metall-Ionen mit einer Komplexbildungskonstanten gegenüber EDTA von über 10^{16} derjenigen von Kobalt, lassen sich jedoch auch mit ^{60}Co als nichtisotopem Indikator bestimmen. Der Analysenlösung wird eine bekannte, überschüssige Menge EDTA und eine bekannte, mit ^{60}Co markierte Menge Kobalt(II)-Lösung zugegeben, analog den in der Komplextometrie üblichen Rücktitrationsmethoden²⁾. Durch elektrophoretische Trennung von Kobalt und Kobaltkomplexon, wie im vorhergehenden Abschnitt beschrieben wurde, lässt sich die Menge des zu bestimmenden Metalls errechnen:

$$M = \text{EDTA} - \text{Co} \cdot Q \quad (0 < Q < 1) \quad (3)$$

Für die Bestimmung mit ^{60}Co als nichtisotopem Indikator kommen in Frage: Bi^{III} , Fe^{III} , Tl^{III} , In^{III} , Hg^{II} , Cu^{II} , Ni^{II} , Pb^{II} , Y^{III} und SE^{III} .

In den folgenden Abschnitten wird auf die Bestimmung der uns in toxikologischer Hinsicht interessierenden Metalle Blei und Thallium eingegangen.

Mikrobestimmung von Blei

Ausführung: Die Bleilösung wird auf Parafilm mit einer überschüssigen Menge EDTA-Lösung versetzt. Darauf wird die Kobaltlösung zugegeben. Wenn Lösungen mit einer EDTA-Konzentration von über 10^{-5}M verwendet werden, kann sofort nach der Kobaltzugabe mit der Elektrophorese begonnen werden; bei verdünnteren Lösungen ist es vorteilhaft, nach der Zugabe des Kobalts das Gemisch ca. 1 Stunde an der Luft unter Licht stehen zu lassen³⁾. Das pH der Lösung soll zwischen 5 und 7 betragen. Die Papierelektrophorese und Bestimmung der Zählraten erfolgt auf die im Abschnitt über die Kobaltbestimmung beschriebene Weise.

Die Figuren 4 und 5 zeigen Eichkurven, die unter den in den Tabellen 2 und 3 aufgeführten Bedingungen erhalten wurden.

Fig. 5 gibt das Resultat einer analogen Versuchsreihe mit grösseren Bleimengen wieder.

Die Q -Werte für $\text{Pb} = 0$ ng und die Neigungen der Titrationskurven in den Figuren 4 und 5 erfüllen innerhalb der Fehlergrenzen die Gleichung (3) (Abweichung vom Sollwert ca. 10%). Aus Fig. 4 geht hervor, dass die Streuung der Methode ca. 0,4 ng beträgt (Standardabweichung).

²⁾ Die Verwendung von eingestellten verdünnten Kobalt(II)-EDTA-Lösungen, analog der Substitutionstitation, hat sich nicht bewährt, da sich das Kobalt nach einigen Tagen, wahrscheinlich durch Bildung des sehr stabilen Co^{III} -EDTA ($K = 10^{36}$), nicht mehr substituieren liess.

³⁾ Durch das Stehenlassen an der Luft findet möglicherweise eine Oxydation von Co^{II} -EDTA zu Co^{III} -EDTA statt, dessen hohe Stabilität und Inertie einen geringen systematischen Fehler bei der Elektrophorese zur Folge hat. Die Reaktion Pb^{II} -EDTA + Co^{II} $\xrightarrow{\text{O}_2}$ Pb^{II} + Co^{III} -EDTA läuft offenbar innerhalb dieser Zeit nicht wesentlich ab.

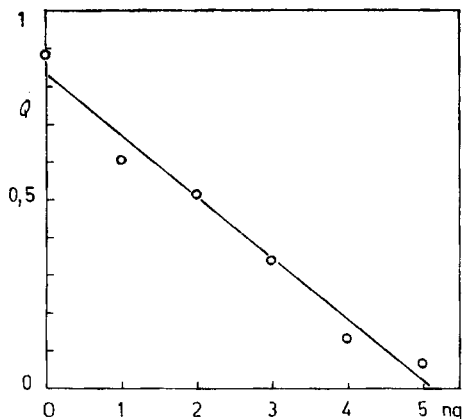


Fig. 4. Relative Radioaktivität Q des Kobaltkomplexonat-Fokus als Funktion der zugegebenen Bleimenge

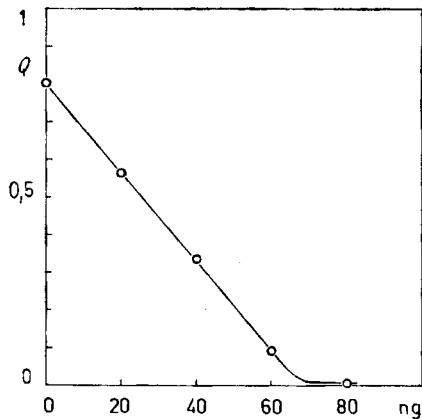


Fig. 5. Relative Radioaktivität Q des Kobaltkomplexonat-Fokus als Funktion der zugegebenen Bleimenge

Tabelle 2. Messdaten zu Fig. 4

Co-Lösung $4 \cdot 10^{-6} M$ μl	Pb-Lösung 0,1 ppm μl	EDTA-Lösung $2 \cdot 10^{-6} M$ μl	Q
je 7,6	0	je 12,5	0,886
	10		0,607
	20		0,516
	30		0,340
	40		0,135
	50		0,068

Elektrodenraumlösung: 0,2M $NaNO_3$. Elektrophorese 4 Stunden nach Kobaltzugabe, während 3,5 Minuten.

Tabelle 3. Messdaten zu Fig. 5

Co-Lösung $5 \cdot 10^{-5} M$ μl	Pb-Lösung 2 ppm μl	EDTA-Lösung $10^{-5} M$ μl	Q
je 8	0	je 36,2	0,804
	10		0,564
	20		0,336
	30		0,093
	40		0,005

Elektrophorese einige Minuten nach der Kobaltzugabe.

Mikrobestimmung von Thallium. – Wegen der geringen Stabilität des Tl^I -EDTA-Komplexes lässt sich das Tl^I -Ion nicht direkt, sondern erst nach Oxydation zu Tl^{III} , mit Kobalt als nichtisotopem Indikator bestimmen.

Bei der Oxydation ist darauf zu achten, dass die Analysenlösung vor der Ausführung der Elektrophorese neutral bis schwach sauer ist, dass keine Substanzen eingeführt werden, die die Komplexbildungsgleichgewichte stören, und, um günstige

Trennbedingungen zu erhalten, dass die Leitfähigkeit der Analysenlösung kleiner ist als diejenige der Elektrodenraumlösung. Im Hinblick auf die bei der Bestimmung von Thallium aus biologischem Material notwendige Abtrennung des Thalliums wurde in den Testversuchen die Oxydation durch Extraktion aus bromhaltiger, bromwasserstoffsaurer wässriger Lösung in Äther und Reextraktion in EDTA-Lösung durchgeführt.

Experimentelles. – Ca. 1 ml 1 N HBr-Lösung, die eine Testmenge Tl-Salz enthält, wird in ein Polyäthylenrohr von ca. 6 mm i. D. gegeben, das an einem Ende ausgezogen und zugeschmolzen wurde. Der Lösung werden einige μl Bromwasser zugegeben, bis eine schwache Gelbfärbung eintritt. Danach wird ca. 1 ml Äthyläther zugegeben. Das Polyäthylenrohr wird zugeschmolzen und während einiger Minuten geschüttelt. Die Phasen werden durch Zentrifugieren getrennt. Das Polyäthylenrohr wird am ausgezogenen Ende aufgeschnitten, und die ätherische Phase, die die Wand benetzt, wird praktisch ohne Verlust in ein zweites Polyäthylenrohr, das wie das erste beschaffen ist, abgegossen, während die wässrige Phase dank der Oberflächenspannung zurückgehalten werden kann. Zur ätherischen Phase wird eine bestimmte Menge EDTA-Lösung gegeben. Das Rohr wird zugeschmolzen und während einiger Minuten geschüttelt. Nach Trennung der Phasen durch Zentrifugieren wird das Polyäthylenrohr am ausgezogenen Ende aufgeschnitten, und die ätherische Phase wird verworfen. Mit etwas Übung gelingt es, die wässrige Phase quantitativ aus dem Polyäthylenrohr, das wie eine Pipette funktioniert, auf ein Stück Parafilm herauszudrücken. Auf diesem wird die Lösung mit einem bekannten Volumen der markierten Kobaltlösung versetzt. Elektrophorese und Auswertung erfolgen auf gewohnte Weise.

Die Ätherphase nimmt bei der Extraktion etwas HBr auf. Um eine neutrale Lösung zur Elektrophorese zu erhalten, haben wir mit einer leicht alkalischen EDTA-Lösung reextrahiert. Wenn 0,7 ml 1 N HBr mit 0,7 ml Äthyläther extrahiert werden und mit 64 μl EDTA-Lösung, die mit NaOH auf pH 8 gebracht wurde, reextrahiert wird, erhält man eine Analysenlösung von pH ca. 6. Um reproduzierbare Resultate zu erhalten, müssen solche empirisch festgestellte Mengenverhält-

Tabelle 5. Messdaten zu Fig. 6

Co-Lösung $5 \cdot 10^{-5}\text{M}$ μl	Tl-Lösung 1 ppm μl	EDTA-Lösung $5 \cdot 10^{-6}\text{M}$ μl	Q
je 8	0	je 63,7	0,772
	20		0,548
	40		0,313
	60		0,110

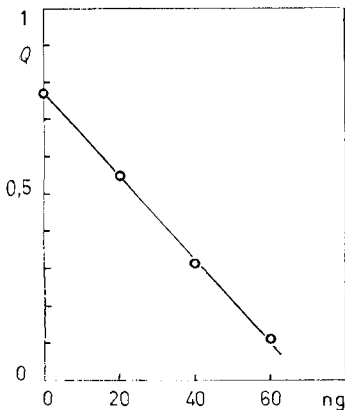


Fig. 6. Relative Radioaktivität Q des Kobaltkomplexonate-Fokus als Funktion der zugegebenen Thalliummenge

nisse eingehalten werden, oder die Analysenlösung muss abgepuffert werden, wobei jedoch darauf zu achten ist, dass keine das Komplexbildungsgleichgewicht störenden Ionen zugeführt werden und die Leitfähigkeit der Analysenlösung unter derjenigen der Elektrodenraumlösung bleibt.

Fig. 6 zeigt, dass die stöchiometrische Gleichung (3) innerhalb der Fehlergrenzen erfüllt ist (Abweichung vom Sollwert ca. 10%). Die Streuung der Methode beträgt in dieser Versuchsreihe ca. 1,5 ng (Standardabweichung).

ZUSAMMENFASSUNG

Nanogrammmengen von Kobalt und anderen Schwermetallen können komplexometrisch bestimmt werden mit ^{60}Co als radioaktivem Indikator, indem Kation und Chelat papierelektrophoretisch getrennt werden.

Zürich, Gerichtlich-Medizinisches Institut
der Universität

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] E. SCHUMACHER & H. J. STREIFF, *Helv.* **41**, 1771 (1958).
- [2] E. SCHUMACHER & W. FRIEDLI, *Helv.* **43**, 1013 (1960).
- [3] J. STARY & J. RUZICKA, *Talanta* **11**, 697 (1964).
- [4] W. FRIEDLI & E. SCHUMACHER, *Helv.* **44**, 1829 (1961).

120. Etudes sur les matières végétales volatiles CXCVIII [1] Contribution à la connaissance des farnésènes

par Yves-René Naves

(29 I 66)

Nous avons rencontré, au cours d'une étude des constituants de l'huile essentielle de palmarosa, étude dont il sera rendu compte ultérieurement, un mélange de sesquiterpènes hydrogénable en farnésane, mais dont la résolution en ses composants n'a pu être accomplie qu'en partie en raison d'isomérisations ou de polymérisations.

Notre connaissance de ce mélange a été toutefois grandement facilitée par l'étude des farnésènes préparés par la déshydratation de farnésols ou de nérolidols. Cette étude a mis en évidence des allofarnésènes qui sont des analogues d'allo-ocimènes et dont les mélanges d'isomères constituent, au moins en partie, ainsi que nous venons de le constater, le «sesquictronellène» de SEMMLER & SPORNITZ [2] et le «sesquiterpène aliphatique» extrait en 1932 de l'huile essentielle d'ylang-ylang des Iles Comores par GLICHITCH et nous-même [3].

Etant donné l'étroite parenté qui lie les farnésols au géraniol et au nérol, les nérolidols au linalol, on pouvait s'attendre à rencontrer parmi les produits de déshydratation de ces alcools sesquiterpéniques les analogues de ceux de la déshydratation du géraniol, du nérol ou du linalol. Cette dernière a été étudiée par divers auteurs; elle donne du β -myrcène, des *cis*- et *trans*-ocimènes, et ceux-ci sont en partie isomérisés en