

## Die Methode der Isotopenverdünnung

Von E. BRODA

Institut für Physikalische Chemie, Universität Wien

### Summary

The isotope dilution principle, invented by HEVESY in 1932 and applied since 1939 to mixtures of similar often organic substances, makes the determination of substances possible that cannot be isolated in quantitative yield. It is based on the near-equality of the chemical properties of isotopes. Stable or radioactive isotopes, more often the latter, are applied. Inactive substances are separated after addition of active isotopes, and the yield in separation found by radiation measurement. Radioactive substances (natural radionuclides or pre-tagged substances), on the other hand, may be assayed after addition of inactive isotopic carrier and (incomplete) separation. The latter variant ("inverse isotope dilution method") is more suitable for trace

analysis. However, except for natural radionuclides, it can in most cases be applied only to systems that are from the beginning "under the control of the analyst," i.e., to systems where the substance to be determined may be labelled in known specific activity. Nevertheless, the substance in question can in some cases be labelled at a later stage by a (usually stoichiometric) reaction with a radioactive reagent (combination of isotope dilution and radioreagent method). By analogy, the term "isotope dilution" is also used for numerous methods in technology, biology and medicine, where unknown volumes or amounts of substances in inaccessible volumes are estimated by addition of isotopes in known quantities and subsequent determination of the dilution, which results from their distribution over the system.

### Vorbemerkungen

Unter den chemischen Methoden, bei denen Isotope verwendet werden, gibt es solche, die – oft in schnellerer, empfindlicherer oder bequemerer Weise – Ergebnisse liefern, die man im Prinzip auch nach anderen Methoden erhalten könnte. Es gibt aber auch Isotopenmethoden, die Resultate geben, die nach anderen Methoden überhaupt nicht zu erhalten sind. Solche Isotopenmethoden sind natürlich besonders wertvoll. Zu ihnen gehört die Methode der Isotopenverdünnung, die durch den 1966 verstorbenen Großmeister der Radiochemie, den Ungarn HEVESY, im Jahre 1932 in die Chemie eingeführt wurde<sup>1</sup>.

Die Methode der Isotopenverdünnung gestattet bei unvollständig ablaufenden chemischen Trennungen die Bestimmung der Ausbeute auch dann, wenn die ursprünglich vorhandene Menge an Substanz unbekannt ist. Es wird sich zeigen, daß dieser Umstand wichtige Möglichkeiten für die analytische Chemie bietet. Eine Übersicht von RUŽIČKA über die Anwendungen der Isotopenverdünnungsmethode allein auf die anorganische und Spurenanalyse aus dem Jahre 1962 gibt bereits 143 Literaturhinweise<sup>2,3</sup>.

Für die Zwecke der Isotopenverdünnung wird die Annahme gemacht, daß Isotope sich chemisch gleich verhalten. Diese Annahme ist bei schweren und mittelschweren Elementen in sehr guter Annäherung erfüllt. Bei leichten Elementen können sich geringfügige Abweichungen ergeben, doch ist anscheinend bei der Methode der Isotopenverdünnung die Präzision bisher fast nie so weit getrieben worden, daß sich merkliche Fehler ergeben hätten. Nur das Element Wasserstoff, wo das Verhältnis der Massenzahlen der Isotope (Protium, Deuterium, Tritium) besonders groß ist, bildet eine Ausnahme, und zwar kann offenbar am ehesten dann ein merklicher «Isotopeneffekt» auftreten, wenn die Isotopen Atome in verhältnismäßig kleine Moleküle oder kleine reaktive Gruppen eingebaut sind<sup>4</sup>.

Die für die Isotopenverdünnungsmethode verwendeten Isotope sind meist radioaktiv. Die radioaktiven Isotope werden stets durch ihre Strahlung nachgewiesen. Es handelt sich also um radiochemische Methoden im Sinne der Definition PANETHS: Die Radiochemie ist die Chemie der Stoffe, die durch ihre (ionisierende) Strahlung nachgewiesen werden.

Stabile Isotope sind teurer als radioaktive Isotope, und ihre Messung ist auch kostspieliger und umständlicher. Jedoch stehen bei einigen Elementen – besonders Sauerstoff und Stickstoff – radioaktive Isotope geeigneter Halbwertszeit nicht zur Verfügung, so daß stabile

Isotope eingesetzt werden müssen. Bei Elementen, die auch geeignete radioaktive Isotope aufweisen, werden stabile Isotope nur in Sonderfällen verwendet. Ein solcher Fall soll am Ende des dritten Abschnittes erwähnt werden. Der Einfachheit halber sollen die Aussagen der vorliegenden Übersicht vorwiegend in bezug auf radioaktive Isotope formuliert werden. Sie gelten aber *mutatis mutandis* auch für stabile Isotope.

Der Verfasser hat in Zusammenarbeit mit SCHÖNFELD<sup>5,6,7,8</sup> im Laufe vieler Jahre eine Klassifikation der «nuklearen» Methoden der chemischen Analyse entwickelt. Unter nuklearen Methoden werden dabei solche verstanden, die mindestens einmal eine Messung ionisierender Strahlung erfordern (bei Methoden mit stabilen Isotopen, die hier wieder außer acht gelassen werden: mindestens einmal die Messung einer Isotopenzusammensetzung). Im vorliegenden Vortrag soll der Platz der Isotopenverdünnungsmethode im Rahmen der Gesamtheit der nuklearen Methoden diskutiert werden, bevor ihre Möglichkeiten im einzelnen aufgezeigt werden. Es wird sich zeigen, daß die Isotopenverdünnungsmethode eine Sonderstellung einnimmt.

### Nukleare Methoden der Analyse

Es ist zweckmäßig, die nuklearen Methoden der Analyse mit Ausnahme der Isotopenverdünnungsmethode zu sieben Gruppen zusammenzufassen, deren Kennzeichen an anderer Stelle diskutiert wurden<sup>8</sup>:

1. Analyse natürlich radioaktiver Stoffe
2. Indikatoranalyse
3. Radioreagensanalyse
4. Aktivierungsanalyse
5. Absorptionsanalyse
6. Streuungsanalyse
7. Emissionsanalyse

Wir beschränken uns hier auf die Gruppen 1 bis 4, da nur diese Gruppen üblicherweise mit dem Isotopenverdünnungsprinzip kombiniert werden. Gruppe 1 (z. B. Bestimmung von natürlichem Kalium durch seine Aktivität) bedarf keiner Erklärung. Gemäß Gruppe 2 wird ein Stoff vor seiner Einführung in ein zu untersuchendes System durch Zusatz eines Isotops in bekanntem Ausmaß markiert («indiziert»), so daß seine Menge stets und überall innerhalb des betreffenden Systems durch Strahlenmessung ermittelt werden kann. Voraussetzungen

<sup>1</sup> G. HEVESY und R. HOBBI, *Z. anal. Chem.* 88 (1932) 1.

<sup>2</sup> J. RUŽIČKA, *Chemické Listy* 56 (1962) 783.

<sup>3</sup> Siehe auch I. P. ALIMARIN und G. N. BILINOVITCH, *Int. J. Appl. Rad. Isotopes* 7 (1960) 169.

<sup>4</sup> Siehe z. B. J. H. LERACH, J. E. SEALEY und P. D. KLEIN, in *Radiochemical Methods of Analyses*, IAEA-Symposium in Salzburg, Band 2, Wien 1965.

<sup>5</sup> E. BRODA und T. SCHÖNFELD, *Radiochemische Methoden der Mikrochemie*, in F. HECHT und M. K. ZACHERL (Herausgeber), *Handbuch der mikroanalytischen Methoden*, Band 2, Wien 1955.

<sup>6</sup> E. BRODA und T. SCHÖNFELD, *Technische Anwendungen der Radioaktivität*, 3. Auflage, Leipzig 1962; erweiterte englische Ausgabe, Oxford 1966.

<sup>7</sup> E. BRODA und T. SCHÖNFELD, *Nuclear Methods in Analytical Chemistry, Proceedings of the Analytical Chemistry Conference*, Budapest 1966.

<sup>8</sup> E. BRODA, *Radiochemische Methoden der Analyse*, 3. Landeskonferenz der rumänischen Chemiker, Timisoara 1966.

gen sind, a) daß der Stoff sich anfangs «unter Kontrolle» des Analytikers befindet, d.h. in bekanntem Ausmaß indiziert werden kann, und b) daß innerhalb des Systems keine Vermischung des indizierten Stoffes mit weiterem inaktivem Stoff der gleichen chemischen Art eintritt, die spezifische Aktivität also konstant bleibt. Nach Gruppe 3 wird nicht der zu bestimmende Stoff selbst indiziert, sondern er wird im Zuge der Analyse mit einem markierten Stoff bekannter spezifischer Aktivität zu – in der Regel stöchiometrischer – Reaktion gebracht. Dann wird das Reaktionsprodukt oder alternativ ein Überschuß von Reagens durch die Strahlung gemessen. Dieser Fall ist besonders dann wichtig, wenn der zu bestimmende Stoff selbst sich von vornherein nicht unter der Kontrolle des Analytikers befindet. Beispiele bilden die von LANGER<sup>9</sup> eingeführten «radiometrischen Titrationsen». Die Gruppe 4 schließlich ist dadurch gekennzeichnet, daß im Gegensatz zu den Gruppen 1 bis 3 überhaupt keine vorgebildeten (natürlichen oder künstlichen) Radionuklide angewendet werden, die Radioaktivität vielmehr erst in der Analysenprobe durch Kernreaktion induziert wird. Die Aktivierungsanalyse ist nur auf die Bestimmung von Elementen – nicht von Verbindungen – anwendbar.

Zur Umrechnung von Meßwerten bei ionisierenden Strahlen, meist von Zählraten, auf die Größe, die den Analytiker letzten Endes interessiert (Menge an Stoff X), wäre bei allen radiochemischen Analysenmethoden von vornherein die Kenntnis verschiedener physikalischer und apparativer Daten nötig. Dazu gehören z.B. Absorbierbarkeiten von Strahlen und Meßausbeuten von Meßgeräten, bei manchen Methoden auch Wirkungsquerschnitte und Strahlenspektren. In der Praxis erleichtert man sich die Aufgabe bekanntlich in entscheidendem Maß durch Anwendung von Relativ- statt Absolutmethoden. Man begnügt sich also mit dem Vergleich des Meßwerts, den die Analysenprobe ergibt, mit jenem Meßwert, den eine Probe bekannten Gehalts an Stoff X (eine Eichprobe) in der gleichen Anordnung ergibt. Die Meßwerte sind jedenfalls in einem weiten Bereich der Menge an Stoff X proportional, so sehr sie auch von anderen Umständen abhängen.

Wenn demnach der Meßwert ein für allemal festgestellt worden ist, den eine Eichprobe ergibt, so liefert eine Strahlenmessung an der Analysenprobe unmittelbar die Menge an Stoff X, ohne daß weitere Messungen nach nicht-nuklearen Methoden notwendig wären. Jedoch ist ein äußerst wichtiger Umstand bisher noch nicht berücksichtigt worden. Der Gehalt an Stoff X in der Meßprobe für die Kernstrahlenmessung ist natürlich nur dann mit dem Gehalt in dem ursprünglichen Material identisch, wenn die Ausbeute bei der Herstellung dieser Meßprobe quantitativ ist. Dies ist aber oft nur unter großem Aufwand oder auch gar nicht zu erreichen, und überdies ist nicht ohne weiteres bekannt, ob und in welchem Ausmaß dieses Ziel erreicht wurde.

Hier ist nun das Prinzip der Isotopenverdünnung anzuwenden, welches – wie anfangs erwähnt – die Bestimmung der Ausbeute bei Abtrennungen im Rahmen der Gruppen 1 bis 4 ermöglicht. Diese «Hilfsfunktion» der Isotopenverdünnungsmethode verleiht ihr unter den nuklearen Methoden ihre Sonderstellung. Die Ausbeutebestimmung erfolgt durch eine weitere Messung – in der Regel nach einer nicht-nuklearen Methode (z.B. gravimetrisch, titrimetrisch oder spektrophotometrisch), gelegentlich auch nuklear (aktivierungsanalytisch<sup>10</sup>). Überdies kann das Isotopenverdünnungsprinzip auf die Bestimmung von Stoffen angewendet werden, die von vornherein inaktiv sind und auch während der Analyse inaktiv bleiben («direkte» Isotopenverdünnung). Dann muß die Bestimmung der Ausbeute nach einer nuklearen Methode erfolgen; auch hier sind also zwei Messungen nach verschiedenen Methoden nötig. Diese Form ist historisch die erste gewesen und soll auch als erste besprochen werden.

#### Die direkte Isotopenverdünnung

Das Prinzip der «einfachen» oder «direkten» Ausführungsform der Isotopenverdünnungsmethode ist das folgende: Dem System wird eine bekannte Menge der zu bestimmenden Komponente (Stoff X) in markierter Form zugefügt. Nach völliger Durchmischung wird die Substanz in reiner Form abgeschieden; daß die Reinheit auf Kosten der Ausbeute geht, wird in Kauf genommen. Sodann wird die Menge an Isotop im abgeschiedenen Stoff durch Strahlenmessung ermittelt. Das Verhältnis dieser Menge zu der ursprünglich zugefügten Menge an Isotop ist die Ausbeute; nach der Grundannahme des gleichen Verhaltens der Isotope muß diese Ausbeute für die aktiven und für die inaktiven Atome, Moleküle bzw. Ionen gleich sein. Aus der Menge an abgeschiedenem Stoff, die nach einem beliebigen Verfahren bestimmt wird, und aus der Ausbeute erhält man schließlich die ursprüngliche im System vorhandene Menge an inaktivem Stoff.

Die schon erwähnte Pionierarbeit von HEVESY<sup>1</sup> bezog sich auf die anodische Abscheidung kleiner Mengen Blei aus salpetersaurer Lösung, wobei die Ausbeute nur einige Prozent betrug. Der Zusatz bestand aus dem radioaktiven Bleisotop Radium D (<sup>210</sup>Pb). So konnten Bestimmungen an 30 g Mineral auf Bleigehalte der Größenordnung 10<sup>-6</sup> Gewichtsteile (p.p.m.) ausgedehnt werden.

Vielfach hat man die direkte Methode auf Gemische ähnlicher Stoffe angewendet, wo die Abscheidung eines reinen Stoffes nicht leicht quantitativ gelingt. Ein Beispiel wäre die Analyse eines Gemisches Seltener Erden. Wenn in einem solchen Gemisch mehrere Komponenten unter Verwendung des Isotopenverdünnungsprinzips bestimmt werden sollen, so ist Zusatz von markierten

<sup>9</sup> A. LANGER, *J. Physic. Chem.* 45 (1945) 639.

<sup>10</sup> J. PAULY, E. SABBIONI und F. GIRARDI, in *Radiochemical Methods of Analysis*, IAEA-Symposium in Salzburg, Band 2, Wien 1965.

Formen aller dieser Komponenten und Abscheidung jeder einzelnen Komponente in reiner Form nötig. Falls die erforderlichen Abtrennungen in ihrer Gesamtheit hierdurch vereinfacht werden, so kann der Zusatz der markierten Stoffe auch gleichzeitig erfolgen.

Das Verfahren wird auch auf Moleküle angewendet. In diesem Fall müssen die Moleküle des Zusatzes in solcher Weise durch Einbau isotoper Atome markiert sein, daß diese nicht gegen Atome anderer Moleküle austauschen. Beispiele sind die Pionierarbeiten zur Bestimmung von einzelnen Aminosäuren bzw. Fettsäuren in Gemischen durch USSING<sup>11</sup> und durch RITTENBERG und FOSTER<sup>12</sup>. Eine Diskussion der Abhängigkeit der Genauigkeit solcher Verfahren von der Reinheit der zugesetzten und der abgeschiedenen Verbindungen und von der Genauigkeit der Bestimmung der Isotopengehalte ist durch GRAFF, RITTENBERG und FOSTER<sup>13</sup> gegeben worden<sup>14</sup>.

Weitere typische Anwendungen dienen der Bestimmung von Naphthalin in Teer<sup>15</sup>, von Basen in Phosphatiden<sup>16</sup> sowie der Analyse von Herbiziden<sup>17</sup>, von Gemischen von Penicillinen<sup>18</sup> und von Nukleotiden<sup>19</sup>. Besondere Probleme ergeben sich bei manchen Stoffen, etwa Aminosäuren, durch Stereoisomerie, doch ist es möglich gewesen, sogar optische Isomere nebeneinander zu bestimmen<sup>12, 13</sup>.

Die Grundformeln für die Berechnungen sind von GEST, KAMEN und REINER<sup>3, 5, 20</sup> ausgearbeitet worden. Für den Fall der direkten Isotopenverdünnung und bei radioaktiver Markierung nehmen diese Formeln unter der üblicherweise erfüllten Voraussetzung, daß die zu analysierenden Stoffe selbst nicht radioaktiv sind, die einfache Form an:

$$S_2 = ([A_1/A_f] - 1) S_1. \quad (1)$$

Dabei bezeichnen  $S_1$  die Menge an Zusatz,  $S_2$  die gesuchte Substanzmenge, und  $A_1$  und  $A_f$  die spezifischen Aktivitäten des Zusatzes bzw. des abgeschiedenen Reinstoffes. Man erkennt, daß zur Auswertung  $A_f$  ermittelt werden muß, also eine spezifische Aktivität. Dazu müssen zwei Größen gemessen werden, nämlich eine Aktivität und eine Substanzmenge.

(Bei analoger Markierung mit stabilen Isotopen ist die Voraussetzung für die Anwendung von Formeln in einfacher Form, daß die Zusammensetzung des zu ana-

lysierenden Stoffes an Isotopen normal ist; siehe die Literatur<sup>5, 20</sup>.)

Wenn der Zusatz des radioaktiven Stoffes in unwägbarer Menge («trägerfrei» oder «trägerarm») erfolgen kann, so gilt die vereinfachte Beziehung

$$S_2 = (A_1/A_f) S_1. \quad (2)$$

Mit trägerfreiem Zusatz kann man arbeiten, wenn die vorliegenden Mengen zwar ohne Zusatz abgeschieden werden können, diese Abscheidung aber nicht quantitativ ist und daher eine Bestimmung der Ausbeute benötigt wird.

Wenn weiter  $G_1$  und  $G_f$  die zugesetzte bzw. abgeschiedene Menge an Radionuklid bedeuten (mit  $G_i = A_i S_i$ ), so gilt schließlich

$$S_2 = (G_1/G_f) S_f. \quad (3)$$

Dies erkennt man übrigens auch unmittelbar. Wieder sind zwei Größen zu messen, nämlich  $G_f$  und  $S_f$ .

Wenn jedoch die zur Abscheidung erforderliche Trägermenge viel größer als die zu bestimmende Menge ist, also häufig bei Spurenanalysen, treten bei der direkten Isotopenverdünnungsmethode besondere Probleme auf. In diesem Falle wird in Gl.(1)  $S_1 \gg S_2$ ; daher wird  $A_1/A_f$  nahezu gleich eins. Infolgedessen geben schon kleine Fehler bei der Bestimmung von  $A_1$  und  $A_f$  große Schwankungen im Ausdruck  $(A_1/A_f) - 1$ .

#### Trägerfreie Abscheidungsmethoden

Aus diesem Grunde hat man Methoden zur trägerfreien Abscheidung von Elementen nach Zusatz von Isotop, also im Rahmen der direkten Isotopenverdünnungsmethode, entwickelt. Insbesondere kann – wenn radioaktive Isotope verwendet werden – die Erfassungsgrenze für Elemente (vorläufig: metallische Elemente) durch Anwendung sogenannter «substöchiometrischer» Verfahren verbessert werden.

Wenn nämlich ein Radionuklid sehr hoher und genau bekannter spezifischer Aktivität zur Verfügung steht, so ergibt seine Vermischung mit dem Element in der Analysenprobe jedenfalls eine starke Veränderung der spezifischen Aktivität; diese Veränderung kann mit befriedigender Genauigkeit unter der Voraussetzung gemessen werden, daß bekannte, sehr kleine Substanzmengen reproduzierbar abgeschieden werden können. Im Rahmen der substöchiometrischen Methode wird dies dadurch erreicht, daß der Lösung kleinere Mengen eines geeigneten spezifischen Komplexbildners zugefügt werden, als der stöchiometrischen Reaktion mit dem zu bestimmenden Element entspricht, so daß der Komplexbildner quantitativ reagiert. Der Komplex wird sodann quantitativ abgetrennt. Diese Abtrennung kann durch Lösungsmittelextraktion, durch Ionenaustausch mit nachfolgender Elution oder auch nach anderen Methoden erfolgen. Die Aktivitäten der derart erhaltenen Lösungen einerseits aus der Radionuklidlösung für sich allein und andererseits aus der mit der Analysenprobe vermischten

<sup>11</sup> H.H. USSING, *Nature* 144 (1939) 977.

<sup>12</sup> D. RITTENBERG und G.L. FOSTER, *J. Biol. Chem.* 133 (1940) 737.

<sup>13</sup> S. GRAFF, D. RITTENBERG und G.L. FOSTER, *J. Biol. Chem.* 133 (1940) 745.

<sup>14</sup> Siehe auch J. KLAS, *Coll. Czech. Chem. Comm.* 31 (1966) 3119.

<sup>15</sup> W.D. MACDONALD und H.S. TURNER, *Chem. & Ind.* 1952, 1001.

<sup>16</sup> E. CHARGAFF, M. ZIFF und D. RITTENBERG, *J. Biol. Chem.* 144 (1942) 343.

<sup>17</sup> R. SÖRENSEN, *Acta Chem. Scand.* 5 (1951) 630.

<sup>18</sup> J.T. CRAIG, J.B. TINDELL und M. SENKUS, *Anal. Chem.* 23 (1951) 332.

<sup>19</sup> R. ABRAMS, *Arch. Biochem.* 30 (1951) 44.

<sup>20</sup> H. GEST, M.D. KAMEN und J.R. REINER, *Arch. Biochem.* 12 (1947) 273.

Radionuklidlösung werden verglichen; das Verhältnis dieser Aktivitäten ergibt das Ausmaß der Isotopenverdünnung und daher die Menge an Element in der Analysenprobe.

Diese von RUŽIČKA und STARÝ systematisch entwickelte Methode, die ein eingehendes Studium der Bildung und Abtrennung von Komplexen erfordert, ist in einer Übersicht dieser Autoren mit allen Einzelheiten und den Literaturhinweisen beschrieben worden<sup>21</sup>. Zu den Elementen, auf die diese Methode bisher angewendet werden kann, gehören Ag, As, Bi, Co, Cu, Fe, Ga, Hg, In, Mo, Sb und Zn. Verfahren zur Analyse mehrerer Komponenten in Gemischen wurden ebenfalls gefunden, und zwar erfolgt die Trennung gewöhnlich durch zweckmäßige Einstellung der Acidität und durch Maskierung<sup>21</sup>. Die Möglichkeit, die substöchiometrische Isotopenverdünnungsmethode kontinuierlich zu gestalten, wird von RUŽIČKA diskutiert<sup>22</sup>.

Als Beispiel diene die Spurenanalyse von Zink in Wasser<sup>21</sup>. Eine bekannte Menge <sup>65</sup>Zn-Lösung bekannter spezifischer Aktivität wird der Probe zugefügt, Diäthanolthiocarbamat wird zur Maskierung zugegeben, die Lösung wird mit Ammoniumpuffer auf pH etwa 8 gebracht, das Zink mit substöchiometrischer Menge Dithizon in CCl<sub>4</sub> 5 min extrahiert und die Aktivität der organischen Schicht bestimmt. In gleicher Weise wird eine Probe der Radiozinklösung für sich allein behandelt. Der Vergleich der beiden Aktivitäten ermöglicht den Schluß auf das Ausmaß der Isotopenverdünnung, die das Radiozink erlitten hat, und daher auf die ursprüngliche Zinkmenge im Wasser. Man erkennt, daß bei der Isotopenverdünnungsmethode nach dem substöchiometrischen Prinzip im Gegensatz zu anderen Ausführungsformen der Isotopenverdünnungsmethode eine einzige Messung genügt, und zwar eine Aktivitätsmessung. Die Messung an der unverdünnten Radiozinklösung wird ja ein für allemal durchgeführt. Der Grund dafür, daß eine Messung hinreichend ist, ist natürlich, daß die abgeschiedene Menge des Stoffes (Ions) vorgegeben und bekannt ist.

In dieser Form ist die direkte Isotopenverdünnungsmethode häufig empfindlicher als die Aktivierungsanalyse. Weitere Vorteile bestehen darin, daß nur geringe Aktivitäten gebraucht werden und die Bestrahlung – meist im Reaktor – entfällt. Andererseits ist die Zahl der brauchbaren Reagentien beschränkt, weil im Bereich extrem kleiner Konzentrationen gearbeitet werden muß. Auch besteht im Gegensatz zur Aktivierungsanalyse die Gefahr der Einschleppung des zu bestimmenden Stoffes als Verunreinigung bei den chemischen Operationen. Dies macht sich insbesondere dann bemerkbar, wenn die Analysenprobe nicht leicht in Lösung zu bringen ist.

Eine ganz andere Möglichkeit zur Anwendung der direkten Isotopenverdünnung auf Spurenanalysen von

Elementen erfordert Massenspektrometrie<sup>23</sup>; wegen deren großen Empfindlichkeit wird ein Zusatz von Träger für Abtrennung und Messung nicht benötigt. Man führt der Probe eine bekannte, sehr kleine Menge an stabilem Isotop des zu bestimmenden Elementes zu, mischt vollkommen durch und bringt das Element – ohne daß eine Abtrennung einer reinen Verbindung erfolgen müßte – in eine Form, in der sie sich massenspektrometrisch untersuchen läßt. Aus dem beobachteten Verhältnis der Häufigkeiten der natürlichen Isotope des Elements und des zugesetzten Isotops erhält man unter Berücksichtigung der Größe des Zusatzes unmittelbar die Gesamtmenge an dem Element in der Probe. Weder spezifische Reaktionen noch quantitative Abscheidungen sind erforderlich.

Ein Beispiel einer erfolgreichen Anwendung ist die Bestimmung von Calcium in Kalium<sup>24</sup>. Das Verfahren ist auch für die Analyse von Wasserstoff in Metallen<sup>25, 26, 27</sup> und – unter Verwendung von <sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N bzw. <sup>18</sup>O – für die Elementaranalyse organischer Verbindungen<sup>28</sup> herangezogen worden. Doch stehen nicht bei allen Elementen geeignete stabile Isotope zur Verfügung<sup>23</sup>. Ferner besteht auch hier die Gefahr von Einschleppung.

Das massenspektrometrische Verfahren ebenso wie das substöchiometrische Verfahren zur Analyse durch direkte Isotopenverdünnung steht bei vielen Elementen in Konkurrenz mit der einfacheren Aktivierungsanalyse; ebenso wie diese sind das massenspektrometrische und das substöchiometrische Verfahren der Isotopenverdünnungsanalyse zur Bestimmung von Verbindungen nicht brauchbar.

#### Die umgekehrte Isotopenverdünnung

Eine weitere Möglichkeit zur Spurenanalyse bietet die «umgekehrte» Isotopenverdünnungsmethode. Der zu bestimmende Stoff muß in bekannter spezifischer Aktivität vorliegen oder markiert werden können, bevor er in das zu untersuchende System eingeführt wird.

Ein für die Anwendung der umgekehrten Isotopenverdünnungsmethode geeignetes System enthält also eine unbekannte Menge eines Stoffes X (atomar oder als Molekül) in bekannter spezifischer Aktivität. Es kann sich um ein natürliches Radioelement handeln, oder auch z. B. um ein radioaktives Produkt der Atomtechnik (z. B. Spaltprodukt) oder schließlich um einen künstlich radioaktiv markierten Stoff. Hier ist freilich in der Regel Voraussetzung, daß die Probe einem System

<sup>21</sup> J. RUŽIČKA und J. STARÝ, *Atomic Energy Review* 2 (1964) 3.

<sup>22</sup> J. RUŽIČKA und M. WILLIAMS, *Talanta* 12 (1965) 967.

<sup>23</sup> M. G. INGRAM, *J. Physic. Chem.* 57 (1953) 809.

<sup>24</sup> M. G. INGRAM, H. BROWN, C. PATTERSON und D. C. HESS, *Physic. Rev.* 80 (1950) 916.

<sup>25</sup> A. N. SAIDEL und A. A. PETROV, *J. Techn. Fis. (russ.)* 25 (1955) 2571.

<sup>26</sup> B. D. HOLT, *Anal. Chem.* 31 (1959) 51.

<sup>27</sup> Siehe auch (Tritium) C. EVANS und J. HERRINGTON, *Radioisotopes in the Physical Sciences and Industry* (Conference Proceedings, Copenhagen 1960), Wien 1962.

<sup>28</sup> A. V. GROSSE, S. G. HINDIN und A. D. KIRSHENBAUM, *Anal. Chem.* 21 (1949) 386.

entstammt, das sich von vornherein unter der Kontrolle des Chemikers befindet.

Zur Analyse wird eine bekannte Menge an unmarkiertem Stoff (Träger) zugefügt. Nach homogener Durchmischung wird die Substanz in Form einer reinen Verbindung isoliert und ihre Menge und Aktivität bestimmt. Bezeichnet man wieder mit  $S_2$  die Menge der zu bestimmenden (hier aktiven) Substanz, mit  $S_1$  die Menge des (hier inaktiven) Zusatzes und mit  $A_2$  und  $A_f$  die spezifischen Aktivitäten der Substanz im ursprünglichen System bzw. im abgeschiedenen Stoff, so gilt der Ausdruck

$$S_2 = S_1 / (A_2 / A_f - 1). \quad (4)$$

Dieser Ausdruck kann durch Vertauschung der auf die Stoffe 1 und 2 bezogenen Größen in Gl. (1) erhalten werden.

(Die Ausbeutebestimmung bei der Abscheidung kann übrigens auch radiometrisch erfolgen, wenn statt des unmarkierten Trägers ein markierter Träger verwendet wird, dessen Strahlung bei der Messung von der Strahlung des zu bestimmenden Nuklids unterschieden werden kann.)

Im Gegensatz zur einfachen Form ist die umgekehrte Form der Methode in allen Fällen zur Spurenanalyse geeignet. In Gl. (4) wird für eine Mikroanalyse  $S_1 \gg S_2$ , d.h. der Ausdruck  $(A_2 / A_f) - 1$  wird groß und fast identisch mit  $A_2 / A_f$ . Man schließt, daß der Fehler der Bestimmung den der Strahlenmessung nicht übertrifft.

Ein Beispiel wäre etwa die Bestimmung der Verteilung eines Spurenelements über ein großes System, z. B. über einen tierischen Organismus. Es sei angenommen, daß das Spurenelement, etwa Brom, von vornherein im System nicht in merklicher Menge vorliegt. Markiertes Spurenelement wird – als Bromid – dem System zugeführt. Die Bestimmung in den Teilen des Systems (Organen oder Geweben) kann nicht durch direkte Strahlenmessung durchgeführt werden, weil die Selbstabsorption der Strahlung zu groß wäre. Man muß daher das Element zunächst durch chemische Verfahren konzentrieren. Zur Bestimmung der Verluste bei der Konzentrierung bedient man sich nun der Isotopenverdünnung. Man setzt der Probe inaktiven Träger (Bromid) in bekannter Menge zu, sorgt für völlige Durchmischung, trennt dann einen Teil des Broms in chemisch reiner Form ab und bestimmt die Ausbeute nach beliebiger, z. B. gravimetrischer Methode.

Die umgekehrte Isotopenverdünnungsmethode ist besonders bei der Untersuchung des Stoffwechsels organischer Wirkstoffe nützlich. Ein Beispiel ist eine Arbeit von SPINKS über die Verteilung und den Abbau von Dicumarol<sup>29</sup>. Den Versuchstieren wurde die markierte Verbindung in bekannter spezifischer Aktivität injiziert,

nach einer bestimmten Zeit wurden die Tiere getötet, den Organen wurde inaktives Dicumarol als Träger zugefügt, und es wurde aus dem Gemisch durch wiederholtes Umkristallisieren reines Dicumarol abgeschieden. Aus der spezifischen Aktivität dieses Stoffes wurde die im Organ vorliegende Menge aktiven Dicumarols berechnet. In analoger Weise konnte man auch die markierten Abbauprodukte bestimmen.

Ähnlich wurde die Haltbarkeit von Vitamin B<sub>12</sub> untersucht<sup>30</sup>. Da das Vitamin in den fraglichen Präparaten nur in kleinsten Mengen vorlag, wurde es für die Versuche in markierter Form (<sup>60</sup>Co) angewendet. Nach längerer Lagerung wurde inaktiver Träger zugefügt und nach Durchmischung reines Vitamin abgetrennt. Der unzersetzte Anteil wurde aus der spezifischen Aktivität berechnet.

Fruchtbar ist auch die Anwendung der umgekehrten Isotopenverdünnung auf Probleme der Strahlenchemie. So ergibt die ionisierende Bestrahlung von Kohlenwasserstoffen in Anwesenheit von Sauerstoff eine Vielfalt von Produkten, deren quantitative Auftrennung und Analyse natürlich schwierig ist. Man kann nun mit Vorteil den Kohlenwasserstoff in markierter Form einsetzen, nach der Bestrahlung die vermuteten Produkte in inaktiver Form als Träger zumischen und dann erst die Auftrennung vornehmen<sup>31</sup>. (Man kann übrigens auch in einem parallelen Versuch – zur Ergänzung – unmarkierten Kohlenwasserstoff in Anwesenheit von Radiojod bestrahlen, wobei sich aus primär gebildeten Radikalen jodierte Kohlenwasserstoffe bilden. Diese werden dann mit inaktiven Trägern abgetrennt<sup>32</sup>. Es handelt sich also bereits um kombinierte Anwendung von Radioisotopenmethode und umgekehrter Isotopenverdünnung, siehe unten.)

Sehr häufig wird die Aktivierungsanalyse mit umgekehrter Isotopenverdünnung kombiniert, wenn nämlich eine zerstörungsfreie Messung der aktivierten Probe nicht möglich ist. Ein Schulbeispiel ist die Bestimmung des sehr kleinen Goldgehaltes von Meteoriten durch BROWN<sup>33</sup>. Der durch Bestrahlung aktivierten und aufgelösten Probe wurde inaktives Gold als Träger zugefügt, das gesamte Gold wurde als Chlorid mit Essigester extrahiert und mit Hydrochinon zum Metall reduziert. Dieses wurde gewogen und seine Strahlung gemessen. Die Ausbeute betrug übrigens etwa 75%.

Auch mit der umgekehrten Isotopenverdünnungsmethode läßt sich das Prinzip der Substöchiometrie kombinieren. So wurden Verfahren zur Bestimmung der Menge an isotopem Träger in radioaktiven Präparaten angegeben. Solche Bestimmungen werden sonst durch empfindliche physiko-chemische Methoden (Spektrophotometrie, Polarographie usw.) ausgeführt. An dieser

<sup>29</sup> C. C. LEE, L. W. TREVOY, J. W. T. SPINKS und L. B. JAKUES, *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* 74 (1950) 151.

<sup>30</sup> C. ROSENBLUM und D. T. WOODBURY, *J. Amer. Pharmac. Assoc.* 41 (1952) 368.

<sup>31</sup> W. H. CLINGMAN und H. H. HAMMEN, *Anal. Chem.* 32 (1960) 323.

<sup>32</sup> G. R. MARTIN und H. C. SUTTON, *Trans. Faraday Soc.* 48 (1952) 823.

<sup>33</sup> H. BROWN und E. GOLDBERG, *Science* 109 (1949) 347.

Stelle kann jedoch auf solche Verfahren nur hingewiesen werden<sup>21, 34</sup>.

Die Analyse radioaktiver Stoffe unbekannter spezifischer Aktivität kann übrigens in manchen Fällen auch durchgeführt werden, indem man parallelen Proben verschiedene Mengen inaktiven Trägers zufügt und dann in jedem Fall die Abscheidung und Strahlenmessung vornimmt. Diese Methode der «doppelten Isotopenverdünnung» kann hier ebenfalls nur kurz erwähnt werden<sup>35, 36, 37</sup>.

Allgemein ist bei der Methode der umgekehrten Isotopenverdünnung die radiochemische Reinheit des abgeschiedenen Reinstoffes kritisch. Vor allem ist Sicherheit nötig, daß die radioaktiven Atome wirklich in die zu isolierende Substanz eingebaut und nicht in anhaftenden Verunreinigungen enthalten sind. Gewichtsmäßig geringe Verunreinigungen können zu sehr erheblichen Fehlern führen, wenn sie große spezifische Aktivität aufweisen. Die Methode der einfachen Isotopenverdünnung bietet diesbezüglich geringere Fehlerquellen, weil die Aktivität ja nur im einheitlichen chemischen Zusatz enthalten ist; der gewünschten Einheitlichkeit dieses Zusatzes versichert man sich aber leicht.

#### Kombination mit Radioreagensmethode

Wir haben betont, daß die umgekehrte gegenüber der einfachen oder direkten Isotopenverdünnung den Vorteil bietet, daß ohne Schaden für die Genauigkeit große Mengen an inaktivem Träger zugesetzt werden dürfen. Um diesen Vorteil auch bei Systemen zu genießen, die sich nicht unter Kontrolle des Chemikers befinden, wo also die gesuchte Substanz nicht von vornherein in bekannter spezifischer Aktivität markiert werden kann, kann man sich in geeigneten Fällen einer Kombination mit der Radioreagensmethode bedienen. Dies geschieht in folgender Weise.

Statt der nicht-radioaktiven Analysenprobe markierte Verbindung zuzufügen, behandelt man die Probe mit einem radioaktiv indizierten Reagens bekannter spezifischer Aktivität. Das Reagens reagiert mit dem gesuchten Stoff quantitativ. Der nunmehr vorliegende markierte Stoff (ebenfalls bekannter spezifischer Aktivität) wird dann nach Zufügung inaktiven Trägers in reinem Zustand, aber nicht mit quantitativer Ausbeute, abgeschieden, d. h. es wird das Prinzip der umgekehrten Isotopenverdünnung angewendet.

Die wichtigste Anwendung dieser Methode ist die Analyse von Aminosäuregemischen nach KESTON, UDENFRIEND und CANNAN<sup>5, 38</sup>. Als Reagens wird am Jod mar-

kiertes «Pipsyl»-Reagens (*p*-Jod-Phenyl-Sulfonylchlorid) verwendet. Diese Verbindung reagiert allerdings mit allen Aminosäuren, so daß eine sorgfältige Trennung der Reaktionsprodukte nach dem Trägerzusatz notwendig ist. Sie erfolgt nach Fällungsmethoden oder chromatographisch. Andererseits bietet die Existenz der parallelen Reaktion mit den verschiedenen Aminosäuren den Vorteil, daß man mit der Herstellung einer einzigen markierten Verbindung – eben des Reagens – auskommt, während man natürlich bei Verwendung der direkten Isotopenverdünnungsmethode markierten Zusatz für jede einzelne Aminosäure bereitstellen müßte. Nach einer verbesserten Ausführungsform des Verfahrens konnten in 1 mg Eiweiß elf verschiedene Aminosäuren, einige von ihnen in Mengen von nur 10 µg, bestimmt werden<sup>39</sup>.

Unter Umständen kann man Radioreagensverfahren auch dann anwenden, wenn die Bildung des aktiven Derivats nicht quantitativ erfolgt. Dann muß allerdings die Ausbeute bei der Bildung des Derivats ermittelt werden. Dies kann ebenfalls durch Isotopenverdünnung geschehen. Man setzt zu diesem Zweck eine radioaktiv markierte Form der zu bestimmenden Verbindung vor Zusatz des markierten Reagens in bekannter Menge und Aktivität zu, wobei die beiden Markierungen durch verschiedene Radionuklide erfolgen müssen. Aus Strahlenmessungen an dem mit beliebigen Trägermengen abgeschiedenen Reinstoff, die eine Bestimmung der beiden Radionuklide nebeneinander gestatten, erhält man dann einerseits die Gesamtausbeute (Produkt der Ausbeuten der Derivatbildung und der Abscheidung), andererseits auch die im abgeschiedenen Reinstoff vorliegende Menge an Reagens. Man kann dann mit Hilfe der bekannten spezifischen Aktivität des Reagens die Menge der zu bestimmenden Substanz berechnen. Die Menge an inaktivem Derivat, die als Träger zugefügt wurde, geht in die Berechnungen nicht ein. Im «Pipsyl»-System kann die Doppelmarkierung mit Jod-131 und mit Kohlenstoff-14 erfolgen<sup>40</sup>.

#### Bestimmung der Ausdehnung und des Stoffgehalts großer Systeme

Nur anhangsweise sei darauf hingewiesen, daß die Methode der Isotopenverdünnung auch zur Bestimmung der Gesamtmenge an Stoff in (einheitlichen) Systemen herangezogen wird, deren Ausdehnung nicht bekannt ist. In einem solchen System kann durch chemische Analyse einer Probe zwar die Zusammensetzung des Systems, etwa in Prozent, nicht jedoch die Gesamtmenge eines Stoffes bestimmt werden. Man kann aber das Volumen des Systems und daher auch die Gesamtmenge an Stoffen bestimmen, wenn ein Stoff zur Ver-

<sup>34</sup> J. RUŽIČKA, *Coll. Czech. Chem. Comm.* 30 (1965) 1808.

<sup>35</sup> K. BLOCH und H. S. ANKER, *Science* 107 (1948) 228.

<sup>36</sup> M. BERENBOM, H. SOBER und J. WHITE, *Arch. Biochem.* 29 (1950) 369.

<sup>37</sup> R. H. MAYOR und C. J. COLLINS, *J. Amer. Chem. Soc.* 73 (1951) 471.

<sup>38</sup> A. S. KESTON, S. UDENFRIEND und R. K. CANNAN, *J. Amer. Chem. Soc.* 68 (1946) 1390.

<sup>39</sup> S. F. VELICK und S. UDENFRIEND, *J. Biol. Chem.* 190 (1951) 721.

<sup>40</sup> A. S. KESTON, S. UDENFRIEND und M. LEVY, *J. Amer. Chem. Soc.* 69 (1947) 3151, 72 (1950) 748.

fügung steht, der sich nach Zugabe gleichmäßig über das System verteilt. Kennt man nämlich die zugegebene Menge und bestimmt – nach Gleichverteilung – die Konzentration des Stoffes an einer entnommenen Probe, so läßt sich das Volumen des Systems berechnen. Der zugegebene Stoff, dessen Verdünnung in dieser Weise bestimmt wird, muß nicht unbedingt mit einem Stoff des untersuchten Systems isotop sein; beispielsweise kann man die Ausdehnung von Flüssigkeitssystemen auch mit löslichen Farbstoffen messen. Die isotopen Stoffe bieten jedoch den wesentlichen Vorteil, sich mit Sicherheit wie eine Komponente des Systems zu verhalten.

Die Verwendung radioaktiver Isotope im Rahmen dieser Methode<sup>41, 42, 43, 48</sup> ist u. a. für physiologische Systeme von Vorteil, weil Zusatz und entnommene Probe so klein gehalten werden können, daß die Funktionen des Systems nicht gestört werden. Viele physiologische Systeme erfüllen die wesentliche Voraussetzung der raschen Gleichgewichtseinstellung. Darauf wird geprüft, indem dem System in Zeitabständen nach der Injektion der aktiven Substanz Proben entnommen und ihre Aktivitäten bestimmt werden; bleiben sie – natürlich unter Berücksichtigung eventuellen Abklingens – konstant, so hat sich Gleichgewicht eingestellt.

So wurde mit deuterium-<sup>44</sup> oder tritium-<sup>45</sup> markiertem Wasser der Wassergehalt des Menschen bestimmt. Zwar tauscht auch ein Teil des Wasserstoffs organischer Körperbestandteile mit Wasserstoff des Wassers aus; doch ist der dadurch verursachte Fehler unbedeutend. Mit Hilfe gelöster markierter Stoffe bestimmt man das extrazelluläre Volumen (radioaktives Bromid) und das Plasmavolumen (radiojodiertes Albumin) des Körpers<sup>41, 48</sup>. Dabei wird angenommen, daß die gelösten Stoffe in dem ihnen zugänglichen Volumen einheitliche Konzentration haben.

Mit Radionatrium<sup>43, 46</sup>, Radiokalium<sup>43, 47</sup> usw. hat man durch Isotopenverdünnung jene Mengen dieser Elemente bestimmt, die mit dem Serum im Austauschgleichgewicht stehen. Unter der fiktiven Annahme, daß die Konzentration auch eines jeden dieser Stoffe in dem ihm zugänglichen Volumen konstant ist, läßt sich auch jedem dieser Stoffe ein solches Volumen – ein sogenannter «Raum» – zuordnen. In Wirklichkeit unterscheiden sich die derart definierten Räume von den zugänglichen

Volumina oft sehr stark, weil An- und Abreicherungen auftreten. Z. B. konzentrieren die Zellen des tierischen Körpers Kalium in solchem Ausmaß, daß der «Kaliumraum» sogar das Volumen des ganzen Körpers stark übertrifft<sup>41</sup>.

Die Verfahren lassen sich offenbar auch auf die chemische Technologie übertragen, wo zugängliche Volumina oder Stoffgehalte von teilweise gefüllten Behältern, Leitungssystemen usw. ermittelt werden. In das zu untersuchende System wird ein Radionuklid in bekannter Aktivität injiziert. Nach vollkommener Durchmischung wird die Aktivität des Nuklids je Volumeneinheit ermittelt und daraus das Volumen des Systems bzw. der Phase, über die sich das Radioelement verteilt hat, oder ein Stoffgehalt berechnet<sup>49, 50</sup>. Nach einem solchen Verfahren läßt sich z. B. unter Anwendung eines geeigneten kurzlebigen Radionuklids die in einem Werk täglich anfallende Menge von Eisenoxidschlamm bestimmen, wobei die Suspension als solche oder das nach Durchmischung abgeschiedene Oxid der Messung zugeführt werden kann<sup>51</sup>. Analog wurde unter Verwendung von Lanthan-140 das Schlackenvolumen im Siemens-Martin-Ofen<sup>52, 53</sup> und unter Verwendung von Gold-198 das Volumen des in einer Elektrolysewanne jeweils vorhandenen metallischen Aluminiums bestimmt<sup>54, 55</sup>.

Anwendungen sind schließlich auch auf die Ökologie – u. a. im Rahmen der angewandten Entomologie – möglich. Z. B. kann man die Anzahl der Mücken in einem abgegrenzten Gebiet (Insel) bestimmen, indem man eine bekannte Anzahl radioaktiver Mücken freisetzt, nach Gleichverteilung eine Anzahl einfängt und den Anteil der markierten Mücken bestimmt. Die Gesamtzahl der Mücken ist dann einfach gleich der Zahl der eingefangenen Mücken, dividiert durch das Verhältnis der Zahlen der eingefangenen und der freigesetzten markierten Mücken. Wenn man die Probenahme in Abständen wiederholt, so erhält man die natürliche Sterblichkeit unter den gegebenen Bedingungen<sup>56</sup>.

Es ist mir eine Freude, Herrn Dozenten Dr. T. SCHÖNFELD für nützliche Diskussionen und Kritik herzlich zu danken.

<sup>41</sup> G. HEVESY, *Radioactive Indicators*, New York 1948.

<sup>42</sup> Siehe E. BRODA, *Radioactive Isotopes in Biochemistry*, Amsterdam 1960.

<sup>43</sup> F. D. MOORE, *Trans. Coll. Physic. Philadelphia* 21 (1954) 106.

<sup>44</sup> I. S. EDELMAN, J. M. OLNEY, A. H. JAMES, L. BROOKS und F. D. MOORE, *Science* 115 (1952) 447.

<sup>45</sup> N. PACE, L. KLINE, H. K. SCHACHMAN und M. HARFENIST, *J. Biol. Chem.* 168 (1947) 459.

<sup>46</sup> F. D. MOORE, *Science* 104 (1946) 157.

<sup>47</sup> G. B. FORBES und A. PERLEY, *J. Clin. Invest.* 30 (1951) 558.

<sup>48</sup> N. VEALL und H. VETTER, *Radioisotope Techniques in Clinical Research and Diagnosis*, London 1958.

<sup>49</sup> D. E. HULL und B. A. FRIES, *Proceedings of the International Conference on Peaceful Uses of Atomic Energy, Geneva 1955*, Band 15, S. 199.

<sup>50</sup> D. E. HULL, *Nucleonics* 13 (4) (1955) 18.

<sup>51</sup> J. W. T. SPINKS, *Proceedings of the Second International Conference on Peaceful Uses Atomic Energy, Geneva 1958*, Band 19, S. 13.

<sup>52</sup> G. R. CHURCH, W. C. HESELWOOD und G. A. NICHOLSON, *Nature* 179 (1957) 1294.

<sup>53</sup> K. G. ERWALL und K. LJUNGGREN, *Proceedings of the Second International Conference on Peaceful Uses of Atomic Energy, Geneva 1958*, Band 19, S. 3.

<sup>54</sup> S. I. REMPEL, *Doklady Akad. Nauk SSSR* 103 (1955) 107.

<sup>55</sup> L. BOZOKY und D. VÖDRÖS, *Proceedings of the Second International Conference on Peaceful Uses of Atomic Energy, Geneva 1958*, Band 19, S. 237.

<sup>56</sup> L. M. COOK und H. B. D. KETTLEWELL, *Nature* 187 (1960) 301.