

Aus der Landwirtschaftlichen Versuchsstation Limburgerhof der
Badischen Anilin- und Soda-Fabrik, Ludwigshafen/Rhein.

Kolorimetrische Bestimmung kleinster Mengen Schwefel.

Von

H. Roth.

Mit 2 Abbildungen.

(Eingelangt am 18. Juli 1950.)

Für unsere Arbeiten zur Bestimmung schwefelhaltiger Pflanzeninhaltsstoffe war es ein unbedingtes Erfordernis, eine Schwefelbestimmungsmethode zur Verfügung zu haben, die es ermöglicht, *kleine* und *kleinste* Schwefelmengen genau zu bestimmen. Wenn man sich vor Augen hält, daß z. B. Getreidekörner etwa 0,1% Gesamtschwefel enthalten, der sich aus mehreren Schwefelverbindungen zusammensetzt, ist leicht zu ersehen, daß bei Arbeiten zur Erfassung dieser Stoffe die üblichen Mikromethoden nur Anwendung finden können, wenn man von unzumutbar großen Mengen Untersuchungsmaterial ausgeht. Diese bedingen dann einen langwierigen Analysengang und führen infolgedessen zu ungenauen Ergebnissen. Methoden zur Bestimmung von Mikrogrammen Schwefel wurden für spezielle Zwecke bereits beschrieben¹ und fanden bei biologischen Arbeiten (z. B. Insulin) gelegentlich Anwendung.

Da diese Methoden den Anforderungen unserer Arbeiten nicht in jeder Hinsicht entsprachen, wurde ein neues Verfahren ausgearbeitet, das als eine Kombination des *Carius*²- bzw. *Wehner*³-Aufschlusses mit der *Lorant*⁴-Methode anzusehen ist. Nach Oxydation des Schwefels jeder Bindungsart zu Sulfat wird dieses anschließend mit Jodwasserstoff- und Ameisensäure zu Schwefelwasserstoff reduziert. Der Schwefelwasserstoff wird schließlich mit Hilfe der *Caroschen* Reaktion als Methylenblau photometrisch bestimmt.

Nach welchem der beiden Aufschlußverfahren (A = *Carius*, B = *Wehner*) man die Analysenprobe am besten oxydiert, hängt von der Art der Probe und der verfügbaren Menge ab.

Nach dem Aufschlußverfahren A wird die Analysenprobe in einem Mikrobombenrohr mit Salpetersäure und *Kaliumnitrat*, das sich mit

dem bei der Oxydation entstehenden Sulfat zu Kaliumsulfat umsetzt, aufgeschlossen. Durch den Zusatz von Kaliumnitrat ergeben sich zwei Vorteile: 1. werden die beim Öffnen der Bombe öfter auftretenden Verluste an freier Schwefelsäure vermieden und 2. können, da das entstandene Kaliumsulfat nicht wie das Bariumsulfat ausfällt, mit einem Aufschluß mehrere Bestimmungen ausgeführt werden, was besonders dann wertvoll ist, wenn man den ungefähren Schwefelgehalt der Analysenprobe nicht kennt. Nach dem Abdampfen der Salpetersäure in einem siedenden Wasserbad muß das nicht umgesetzte Kaliumnitrat mit *Arndscher* Legierung reduziert werden, da Spuren von Nitrat nach der anschließenden Reduktion des Sulfats zu Schwefelwasserstoff diesen auf seinem Wege zur Absorptionsvorlage oxydieren, wodurch zu niedrige Schwefelwerte erhalten werden.

Den Aufschluß in der Mikrobombe wird man mit einer normalen Mikroeinwaage (3 bis 6 mg) durchführen, wenn der Schwefelgehalt der Analysenprobe über 0,2% liegt, wie es bei Proteinverbindungen und deren Bausteinen, Nucleoproteiden und anderen hochmolekularen organischen Substanzen mit schwefelhaltigen Gruppen der Fall ist. Für Analysenproben mit noch geringem Schwefelgehalt, wie z. B. bei der Bestimmung von Schwefel^{spuren} in anorganischen und organischen Verbindungen, kann die Einwaage auf das 2- bis 4fache ohne Bedenken erhöht werden.

Auch zur Analyse kleiner Volumina (0,5 bis 2 ml) wäßriger Lösungen (Hydrolysate, Blut, Harn u. a.) wird man den Aufschluß in der Mikrobombe benutzen. Um das Wasser zu verdunsten, bläst man in das in ein kochendes Wasserbad gebrachte Mikrobombenrohr Luft ein und schließt den Rückstand wie die festen Proben auf.

Ferner wird man das Verfahren A für „Sonderanalysen“ dann heranziehen, wenn z. B. von einer aus Naturstoffen isolierten Substanz nur einige Zehntel-Milligramme für die Schwefelbestimmung abgezweigt werden können. Steht keine empfindlichere als die übliche Mikrowaage zur Wägung der kleinen Menge zur Verfügung, bringt man einen aliquoten Teil der in einem geeigneten Lösungsmittel gelösten Substanz in das Bombenrohr und verdampft vor dem Zugeben der Salpetersäure das Lösungsmittel.

Der hier gezeigte Schritt von der Mikro- zur Ultramikromethodik ist für die Bestimmung des Schwefels in einem mikroanalytischen Untersuchungslaboratorium noch verfrüht, solange Waagen, die Wägungen bis zu $\pm 0,2\gamma$ genau erlauben, für das Laboratoriumspersonal im kontinuierlichen Betrieb nicht zur Verfügung stehen und die lichtelektrische Farbwertbestimmung an Stelle der visuellen erfolgen kann. Analysesubstanzen, die einige und mehr Prozente Schwefel enthalten, wird man vorläufig nach den Methoden von *F. Pregl* oder *W. Zimmermann*⁵

bestimmen. Unsere Methode soll besonders dort Anwendung finden, wo die Mikromethoden die Grenzen ihrer Leistungsfähigkeit bereits erreicht haben.

Um den Schwefel in Pflanzen- und anderem biologischen Material zu bestimmen, von dem mit Rücksicht auf den Durchschnittswert Einwaagen bis zu 500 mg erforderlich sind, wie auch bei der Analyse physiologischer Lösungen (Körperflüssigkeiten), wird man den Aufschluß der Analysenprobe nicht in der Mikrobombe, sondern nach Verfahren B durchführen. Es beruht auf einer Modifikation der von *O. Wehner*³ beschriebenen Verbrennung in einer geschlossenen Sauerstoffatmosphäre. Feste Proben, besonders pflanzliche, werden in einem Tiegel mit Magnesiumoxyd und Natriumcarbonat (Eschka-Mischung) gemischt und in einer mit Sauerstoff gefüllten Flasche, deren Innenwandung mit Lauge benetzt wurde, verbrannt. Für die Verbrennung sauerstoffarmer fester Proben nach dem Aufschlußverfahren B, wie z. B. Proteine, ist die Zumischung der gleichen bis doppelten Menge Saccharose zu empfehlen. Flüssige Proben, z. B. Blut und andere wäßrige Lösungen, pipettiert man in einen Tiegel, fügt ein zusammengeknülltes Filtrierpapier oder einen Wattebausch als brennbaren Träger* hinzu, der die Lösungen aufsaugt, und verbrennt nach dem Trocknen wie feste Substanzen.

Die Reduktion des Sulfats zu Schwefelwasserstoff und dessen Bestimmung erfolgt in den Aufschlüssen A und B in gleicher Weise.

Die „Flaschenmethode“ ist besonders geeignet für Reihenuntersuchungen. Mit 10 Apparaturen können von zwei Laboratoriumskräften täglich 70 Analysen durchgeführt werden. Zur Analyse von flüchtigen Schwefelverbindungen ist die Flaschenmethode nicht geeignet. Die Verbrennung solcher Substanzen, wie Prüfungen auf Schwefelverunreinigungen organischer Lösungsmittel, führt man am besten in der *Grote-Krekeler*⁶-Apparatur durch und bestimmt den Schwefel mit Hilfe der Methylenblaureaktion.

Das Reduktionsgemisch ist ähnlich dem von *St. Lorant*⁴ beschriebenen. Es besteht aus 100 Vol.-Teilen Jodwasserstoffsäure ($d = 1,70$) und 75 Vol.-Teilen Ameisensäure (85%ig). An Stelle des bislang verwendeten roten Phosphors setzen wir Kaliumhypophosphit zu. Wie aus Tabelle I zu ersehen ist, erhält man nur innerhalb eines bestimmten Mischungsverhältnisses der Jodwasserstoff- und Ameisensäure (43 bis 53 Vol.-% Ameisensäure) konstante Werte. Darauf hat man besonders bei wiederholter Verwendung des Reduktionsgemisches (Dichtebestimmung) zu achten.

* Bei der Verbrennung mit Trägern erübrigt sich die Eschka-Mischung.

Tabelle 1.

% HCOOH (85%) in H ₂ J (d=1,70)	Dichte des Gemisches	Abgelesene Extinktionen für 33,4 γ Schwefel			
0	1,70	0,64	0,68	0,64	0,59
1	1,70	0,66	0,57	0,66	0,64
2	1,698	0,70	0,59	0,67	0,52
3,34	1,690	0,67	0,70	0,62	
12,2	1,652	0,57	0,60	0,62	0,59
25,3	1,580	0,59	0,62	0,60	0,65
35,0	1,525	0,60	0,64	0,59	
39,0	1,510	0,62	0,60	0,58	
42,5	1,496	0,58	0,57	0,58	0,58
53,2	1,430	0,59	0,58	0,57	0,58
60,6	1,400	0,53	0,54	0,55	

Die Methylenblaureaktion. Der aus dem Sulfat gebildete Schwefelwasserstoff wird in einem Wasserstoffstrom in eine Zinkacetatlösung übergeführt, in der er Zinksulfid bildet. Für die Carosche Reaktion versetzt man mit einer schwefelsauren Dimethyl-p-phenyldiaminlösung. Der dabei frei werdende Schwefelwasserstoff bildet mit dem Dimethyl-p-phenyldiamin Leukomethylenblau, das schließlich mit einem Ferrisalz zu Methylenblau oxydiert wird.

Neben Leukomethylenblau bilden sich auch Wursters-Rot, Sulfidgrün und Methylrot. Nach Untersuchungen von *A. Bernthsen*¹⁰ und *St. Lorant*⁴ gehen Wursters-Rot und Sulfidgrün in kurzer Zeit in Methylenblau über. Nur etwa $\frac{1}{50}$ des Schwefelwasserstoffs bildet bei der Caroschen Reaktion beständiges Methylrot, das unter gleichen Versuchsbedingungen eine dem Methylenblau proportionale Größe darstellt und daher als Fehlerquelle nicht in Betracht kommt.

Die so erhaltenen Methylenblaulösungen zeichnen sich durch große Beständigkeit (über mehrere Stunden) aus. Ihre Extinktionen werden im Zeisschen Stufenphotometer* abgelesen und der Schwefelgehalt aus der in Abb. 2 gebrachten Extinktionskurve ermittelt.

An dieser Stelle sei noch darauf hingewiesen, daß die 10fachen Mengen an Selen, Antimon und Arsen die kolorimetrische Bestimmung des Schwefels nicht stören.

Unter Berücksichtigung der zur Zeit zur Verfügung stehenden Laboratoriumsbehelfe (Waagen, Reagenzien, Photometer) wird die höchste Genauigkeit und größte Sicherheit bei der nachstehend beschriebenen Analyse erreicht, wenn von den Aufschlußlösungen Mengen verwendet werden, die 10 bis 40 γ Schwefel entsprechen.

* Für den Extinktionskoeffizienten für Farbfilter „S 66“ (660 mμ) wurde $\epsilon = 8,667 \times 10$ berechnet.

Auf Grund einer großen Zahl von Testanalysen beträgt in diesem Bereich die Genauigkeit der Bestimmung (nach beiden Aufschlußverfahren) 3%. Für Analysenproben, die nur einige Zehntel oder Hundertstel Prozent Schwefel enthalten, ebenso für Leitungswasser, in dem 0,00135 und 0,00136%* Schwefel gefunden wurden, kann die bis jetzt erreichte Genauigkeit als zufriedenstellend bezeichnet werden. Um jedoch Substanzen von hohem Schwefelgehalt innerhalb der in der Mikroanalyse üblichen Fehlergrenze zu bestimmen, müßte vor allem die Ablesung der Methylenblaulösungen in einem lichtelektrischen Kolorimeter erfolgen, das nach *G. Kortüm*⁷ mit einem Fehler von 0,1% arbeitet, während die Genauigkeit des Stufenphotometers (Zeiss) unter günstigsten Bedingungen 1,4% beträgt.

Die Empfindlichkeit der Methode ermöglicht es, in nur einigen hundert Milligrammen physiologischen Materials nach dessen fraktionierter Aufteilung die Schwefelverbindungen über ihren Gesamtschwefel dort zu bestimmen, wo empfindliche spezifische Reaktionen fehlen. Über den Analysengang zur Bestimmung von schwefelhaltigen Substanzen in biologischem Material soll demnächst berichtet werden.

Bei unseren Versuchen, die Methode weiter zu verfeinern, um nur einige Mikrogramme Schwefel zu bestimmen, stießen wir insofern auf Schwierigkeiten, als die Reinigung der Reagenzien nur so weit gelang, daß die für eine Analyse nötigen Mengen zusammen mit dem dest. Wasser 0,1 bis 0,2 γ Schwefel enthielten. Bis jetzt bestand jedoch kein Erfordernis, so kleine Mengen zu bestimmen, weshalb wir die Versuche zur Darstellung *absolut* schwefelfreier Reagenzien vorläufig zurückgestellt haben. Da, wie schon gesagt wurde, von den Aufschlußlösungen meistens aliquote Teile für die Bestimmung des Schwefels verwendet werden, beeinflußt der aus den Reagenzien stammende Blindwert die Analysengenauigkeit praktisch nicht. Wie man Reagenzien, die den Anforderungen unserer Methode entsprechen, erhält, wird weiter unten beschrieben.

Es folgt nun die Beschreibung der Apparatur, die Prüfung der Reagenzien auf ihre Eignung und, wenn erforderlich, deren Reinigung. Anschließend an die Ausführung der Bestimmung werden in der Tabelle 2 einige Analyseergebnisse gebracht, aus der die universelle Anwendung des Verfahrens zu ersehen ist.

Praktischer Teil.

Apparatur (Abb. 1). Sie besteht aus einem Rundkölbchen von 50 ml Inhalt, das zum Eindunsten der Aufschlußlösung und gleichzeitig für die Reduktion Verwendung findet. Mittels eines Normalschliffes wird es an den Destillationsteil der Apparatur angeschlossen. In den inneren

* In 3 ml bestimmt.

Hohlsliff führt das Zuleitungsrohrchen für den Wasserstoff, durch das auch das Reduktionsgemisch eingebracht wird. Letzteres wird in den graduierten Meßzylinder gebracht, der unten einen Glashahn und oben einen Normalschliff trägt, über den die Verbindung mit der Wasserstoffflasche hergestellt wird. Wie aus der Abbildung zu ersehen ist, muß das seitlich eingeführte Zuleitungsrohrchen bis in die Mitte des Schliffes reichen. Über eine birnenförmige Erweiterung ist der Schliff mit dem Rückflußkühler verbunden. Von diesem führt ein horizontales Ableitungsrohr, das am Ende rechtwinklig abgelenkt ist, zur Absorptionsvorlage. Etwa

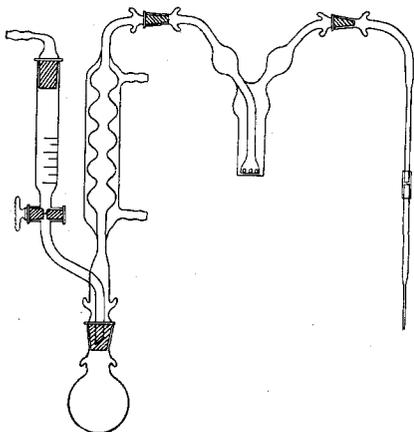


Abb. 1. Apparatur zur Bestimmung von Ultramikro-Mengen Schwefel.

in der Mitte des Rohres ist eine Waschvorrichtung mittels zwei gleicher (trockener) Normalschliffe zwischengeschaltet. Über das Ende des Gasableitungsrohres wird ein etwa 2 cm langes Gummischlauchstück geschoben und in dieses ein gleich starkes Röhrchen, das zu einer starkwandigen Spitze von $\frac{1}{2}$ mm lichte Weite ausgezogen wurde, unter Glas-an-Glas-Verbindung eingesetzt. Im allgemeinen benutzt man als Absorptionsvorlage Meßkölbchen mit Schliffstopfen von 50 ml Inhalt.

Reagenzien. Da es nicht möglich ist, alle für unsere Zwecke erforderlichen Reagenzien schwefelfrei zu beziehen, wird deren Reinigung beschrieben. Wie bereits gesagt, fordern wir eine so weitgehende Reinheit, daß die für eine Analyse verwendeten Mengen zusammen mit dem dest. Wasser nicht mehr als $0,2\gamma$ Schwefel enthalten dürfen. Da für die Überprüfung der Reagenzien das Reduktionsgemisch erforderlich ist, wird seine Herstellung zuerst beschrieben.

Reduktionsgemisch: Am zweckmäßigsten bereitet man sich gleich eine größere Menge des Gemisches. Man bringt in einen Rundkolben von 500 ml Inhalt, der den gleichen Normalschliff wie der Destillationsteil der Apparatur besitzt, 100 ml Jodwasserstoffsäure (zur Methoxybestimmung $d = 1,7$), 75 ml 85%ige Ameisensäure und 1 g Kaliumhypophosphit (KH_2PO_2). Steht keine Ameisensäure von hoher Reinheit zur Verfügung, destilliert man sie zweimal unter Zusatz von etwa 0,5 g Bariumchlorid. Um das Gemisch vollständig von Schwefel zu befreien, muß es ausgekocht werden. Dazu wird der Kolben an eine Apparatur (ohne Waschvorrichtung), die man nur dafür benutzt, angeschlossen und die Vorlage mit 20 ml Absorptionslösung beschickt. Sobald der Wasserstoffstrom so eingestellt ist, daß die Bläschen in der Vorlage in

rascher Folge hochsteigen, beginnt man mit dem Erhitzen des Gemisches unter Rückfluß. Trübt sich während des Austreibens des Schwefelwasserstoffes die Vorlage stark, ersetzt man sie durch eine neue. Im allgemeinen ist das Gemisch nach 45 Minuten langem Kochen frei von Schwefel. Zur Überprüfung schließt man eine neue Absorptionslösung an und führt nach 15 Minuten in der bei der Ausführung der Analyse beschriebenen Weise die *Carosche* Reaktion durch. Da erfahrungsgemäß auch schwefelfreie Proben nach der Destillation eine schwach gelbliche Färbung hervorgerufen, für die im Stufenphotometer Extinktionen zwischen 0,02 bis 0,04 abgelesen werden*, ist das Gemisch, wenn keine stärkere Färbung auftritt, als schwefelfrei anzusehen. Zeigte die Prüfung noch Schwefelwasserstoff an, ist bis zur Erreichung der geschilderten schwachen Verfärbung in neue Vorlagen weiter zu destillieren. Nach dem Abkühlen bewahrt man das Gemisch in einer braunen Vorratsflasche auf. In der Praxis hat sich gezeigt, daß das so hergestellte Reduktionsgemisch, wenn es nicht gleich benutzt wird, nach mehrtägigem Stehen bei neuerelichem Aufkochen Spuren von Schwefelwasserstoff abgibt. Wir haben es uns daher zur Regel gemacht, die für einen Arbeitstag erforderliche Menge vor der Testanalyse an die Apparatur anzuschließen und 15 Minuten lang auszukochen.

Das Reduktionsgemisch kann ohne Bedenken zweimal benutzt werden. Bei weiterer Verwendung hat man es, wenn es frei von Salzen und Metallen aus der *Arndschen* Legierung ist, auf die in der Tabelle 1 angeführte Dichte einzustellen. Ist es unbrauchbar geworden, destilliert man die Jodwasserstoffsäure fraktioniert ab und verwendet das Destillat mit der Dichte von 1,70 zur Herstellung eines neuen Reduktionsgemisches.

Dest. Wasser: Gewöhnliches, auch doppelt dest. Wasser ist infolge des geringen Sulfatgehaltes für die Bereitung von Lösungen, die vor der Reduktion Verwendung finden, wie für das Ausspülen der Mikrobombe ungeeignet. Man reinigt es durch Destillation über Bariumchlorid aus einer Schliffapparatur. 100 ml des so hergestellten dest. Wassers enthalten noch 0,5 bis 1 γ Schwefel.

Methanol-Wasser-Gemisch (9 : 1): Zum quantitativen Überspülen des Bombeninhaltes in das Reduktionskölbchen sind 15 bis 20 ml Flüssigkeit nötig. Mit Wasser würde folglich etwa 0,1 γ Schwefel in die Aufschlußlösung gebracht werden, die, wenn der ganze Aufschluß für die Bestimmung verwendet wird, allein schon etwa 0,3% des zu bestimmenden Schwefels ausmachen würden. Da der von uns benutzte Methylalkohol frei von Schwefel ist, verwenden wir als Spülflüssigkeit ein Gemisch aus 9 Vol.-Teilen Methanol und 1 Vol.-Teil dest. Wasser.

Kaliumbikarbonat, Merck, p. a. ist schwefelfrei.

* Eine vollkommen farblose Lösung haben wir noch nie erhalten.

Salpetersäure, 65%ig, hergestellt durch Destillation aus einer Schlißapparat unter Zusatz von 0,5 g Bariumchlorid.

Schwefelfreies Ammoniak: Wird durch Isothermdiffusion aus technischem Ammoniak nach *E. Abrahamczik*⁸ hergestellt.

Magnesiumchlorid, Merck, p. a.

Arndsche Legierung, Kupfer-Magnesium-Legierung (60 : 40).

Salzsäure 1 : 1: Etwa 750 ml konz. Salzsäure werden zweimal mit je 0,5 g Bariumchlorid durch Destillation aus einer Schlißapparat vor Sulfat befreit und schließlich mit gleichem Volumen dest. Wassers versetzt. Zur Prüfung werden 15 ml im Rundkölbchen zur Trockne eingengt und anschließend die Blindwertbestimmung durchgeführt.

6%ige Natronlauge, hergestellt aus Natriumhydroxyd, Merck, p. a., erwies sich als schwefelfrei.

Natriumperoxyd, Merck, p. a.: Der Sulfatgehalt des Präparats (0,001%) beeinflusst bei der Flaschenmethode, bei der nur in aliquoten Teilen der Lösung der Schwefel bestimmt wird, die Genauigkeit der Analyse nicht.

Eschka-Mischung: Sie besteht aus 2 Gewichtsteilen Magnesiumoxyd und 1 Gewichtsteil Natriumcarbonat. Zur Prüfung auf ihre Brauchbarkeit werden je 200 mg der Salze in dem Reduktionskölbchen mit der schwefelfreien Salzsäure neutralisiert und zur Trockne eingedampft. Der Schwefelgehalt wird wie bei einer normalen Analyse ermittelt. Falls die Präparate nicht schwefelfrei sind, müssen sie gereinigt werden.

Schwefelfreies Filtrierpapier (Watte) und *schwefelfreie Saccharose*.

Die Überprüfung der Reagenzien nimmt man am besten mit einer zugesetzten Kaliumsulfat-Standardlösung von unbekannter Extinktion vor, da die kleinen Extinktionswerte der Reagenzien allein eine genaue Reinheitsprüfung aus angeführten Gründen nicht ermöglichen.

Waschlösung: In einem 100-ml-Meßkolben löst man 10 g sek. Natriumphosphat p. a. in 50 ml Wasser, fügt dann 10 g Pyrogallol p. a. hinzu und füllt mit Wasser bis zur Marke auf. Von dieser Lösung, die während des Stehens dunkel wird und trotzdem über Monate brauchbar bleibt, bringt man 2 ml in die Waschvorrichtung. Obgleich die Waschflüssigkeit wenig beansprucht wird, erneuern wir sie alle 1 bis 2 Wochen.

*Absorptionslösung**: 500 g Zinkacetat p. a., 100 g Natriumacetat und 0,5 g Natriumchlorid p. a. werden in 10 l dest. Wasser gelöst. Nach 1 Tag Stehen wird die etwas trübe Lösung filtriert. Prüfung durch die *Carosche* Reaktion.

*Dimethyl-p-phenylendiaminlösung**: In einen 2-l-Meßkolben werden 1 g Dimethyl-p-phenylendiamin-sulfat oder -hydrochlorid Merck, p. a. mit 100 ml Wasser aufgeschlemmt und unter Kühlung 400 ml konz.

* Die mit * bezeichneten Lösungen können mit gewöhnlichem dest. Wasser hergestellt werden.

Schwefelsäure, $d = 1,84$, vorsichtig zugegeben. Unter weiterem Kühlen wird mit dest. Wasser auf 2 l ergänzt.

*Eisenalaunlösung**: 25 g Ferriammonsulfat p. a. werden zuerst mit 5 ml konz. Schwefelsäure, $d = 1,84$, versetzt und vorsichtig mit dest. Wasser auf 200 ml aufgefüllt.

Ausführung der Analyse:

1. Nach dem Aufschlußverfahren A (Mikrobombenrohr).

Feste Substanzen werden in üblicher Weise mit einem Wägeröhrchen mit langem Stiel in das Mikrobombenrohr eingewogen. Größere Mengen von Flüssigkeiten bringt man mit der Pipette auf den Boden des Bombenrohres und verdampft daraus den wäßrigen Anteil in einem siedenden Wasserbad unter Einblasen von Luft**. Zur Einwaage kleiner Flüssigkeitsmengen benutzt man das Mikrowägegläschen⁹. Enthält die Untersuchungslösung Salzsäure (Proteinhydrolysat), muß sie vorher mit Ammoniak neutralisiert werden. Ein Überschuß an Ammoniak schadet nicht, da dieses sich beim Eindampfen verflüchtigt. Freie Salzsäure muß beim Bombenaufschluß unbedingt vermieden werden. Sie löst Schwefel aus dem Glas (Glaubersalz). Mit Salpetersäure allein treten mit Jenaer Glas keine Störungen auf. Sodann wird in die Bombe noch eine kleine Menge reinstes Kaliumbikarbonat (etwa 1 mg) und 0,30 ml schwefelfreie Salpetersäure gegeben. Die zugeschmolzene Bombe wird nun in einem Aluminiumblock oder Schießofen 6 Stunden lang auf 300° erhitzt. Nach dem Erkalten wird die in der Bombenspitze befindliche Salpetersäure durch schwaches Erwärmen mit einer Sparflamme in den weiteren Teil der Bombe zurückgetrieben. Nachdem man durch Erhitzen der Bombenspitze den Druck abgelassen hat, wird das Bombenrohr unter der Verjüngungsstelle abgesprengt und der Inhalt mit 15 bis 20 ml 90%igem wäßrigen Methanol quantitativ in ein Reduktionskölbchen übergespült und in einem siedenden Wasserbad unter Aufblasen von Luft zur Trockne eingedampft. Anschließend wird der Rückstand mit 6 bis 7 ml dest. Wasser gelöst, mit 4 Tropfen gesättigter Magnesiumchloridlösung und 200 mg Arndscher Legierung versetzt. Unter Aufblasen von Luft wird nochmals im kochenden Wasserbad bis zur Trockne abgedunstet. Nun wird noch 1 ml 85%ige Ameisensäure hinzugefügt und abermals eingedampft. Dann wird das Kölbchen an die *Lorant*-Apparatur angeschlossen und der Schwefel, wie weiter unten beschrieben, bestimmt.

* Die mit * bezeichneten Lösungen können mit gewöhnlichem dest. Wasser hergestellt werden.

** Die Luft, die einer Stahlflasche oder einer Druckleitung entnommen wird, reinigt man in zwei hintereinander geschalteten, mit 2 n Natronlauge beschickten Waschflaschen.

2. Nach dem Aufschlußverfahren B (Flaschenmethode).

a) Feste Proben.

Mit Rücksicht auf eine gute Durchschnittsprobe werden in einem Porzellantiegel von etwa 50 mm Durchmesser und einer Höhe von 30 mm, in den man schon vorher 100 mg Eschka-Mischung gebracht hat, 500 mg trockenes Untersuchungsmaterial eingewogen und mit weiteren 50 mg Eschka-Mischung überschichtet*. Will man Proteine und andere sauerstoffarme Substanzen mit der Flaschenmethode analysieren, so mischt man sie an Stelle der Eschka-Mischung mit der 1- bis 2fachen Menge Zucker, mit dem die Probe genügend heiß und vollständig verbrennt.

b) Lösungen.

Die Aufbringung der Analysenlösung auf den Träger ist einfach. Je nach Schwefelgehalt der Proben werden 1 bis 5 ml in einen gleichen Porzellantiegel, wie er bei festen Proben verwendet wird, pipettiert und im Trockenschrank bei 60° auf etwa 0,5 ml eingeengt. Nun bringt man in den Tiegel ein etwa 10 cm² großes schwefelfreies Filtrierpapier, das zu einer Kugel zusammengeknüllt wurde, oder einen haselnußgroßen Wattebausch. Sodann trocknet man im Schrank so lange weiter, bis der Tiegelinhalt vollkommen trocken ist. Die Verbrennung der Probe erfolgt in einer Weithalsglasflasche mit Schliffstopfen von 2 l Inhalt. In diese werden 10 ml 6%ige Natronlauge gebracht und anschließend 2 Minuten lang Sauerstoff aus einer Stahlflasche eingeleitet. Der Stopfen wird wieder aufgesetzt, die Flasche umgelegt und so lange gedreht, bis die Wandung vollständig mit Lauge benetzt ist, Flaschenhals und Stopfen müssen dabei trocken bleiben. Nun bringt man in den Tiegel ein 4 cm langes und 3 mm breites Salpeterpapier**, dessen eines Ende in die Probe geschoben wird. Zur Verbrennung (Schutzbrille) entzündet man das herausragende Ende des Salpeterpapiers, nimmt den Stopfen von der Flasche ab, bringt mit einer langen Tiegelfange den Tiegel auf den Flaschenboden, setzt sofort den Stopfen auf und festigt den Schliff durch vorsichtiges Eindrehen des Stopfens. Der Verbrennungsvorgang dauert 3 bis 5 Minuten, dabei bilden sich weißgraue Nebel, die nach einigen Stunden wieder verschwinden. Für die Praxis hat es sich am besten erwiesen, das Einwiegen und Verbrennen der Proben am Ende eines Arbeitstages vorzunehmen. Am nächsten Morgen lockert man den Stopfen der Flasche durch leichtes Klopfen mit einem Holzstab, hebt den Tiegel mit der Zange über den Flaschenhals und spritzt ihn äußerlich mit dest. Wasser ab. Nach Zugabe von 5 bis 10 mg Natrium-

* Bei Proben, die sich sehr fein zerkleinern lassen, oder bei Substanzmangel kann noch mit Einwaagen bis zu 100 mg gearbeitet werden, entsprechend ist auch der Zusatz an Eschka-Mischung zu erniedrigen.

** Bereitet durch Eintauchen von Filterpapier in 10%ige Kaliumnitratlösung.

peroxyd und 1 ml dest. Wasser wird der Tiegel auf einer elektrischen Heizplatte unter ständigem Verreiben des Veraschungsrückstandes bis zum Aufkochen erhitzt, der Tiegelinhalt in eine Glas- oder Porzellanschale gegossen und mit dest. Wasser nachgespült. Zu den eventuell im Tiegel haften gebliebenen Verbrennungsresten werden ein- oder zweimal 2 ml Salzsäure 1 : 1 zugegeben, erwärmt und der Inhalt mit Wasser in die gleiche Schale übergespült. Nun werden in die Flasche 15 ml Salzsäure gebracht, die Wandung, wie vorher beschrieben, damit benetzt und der Inhalt zur Lösung in die Porzellanschale übergespült. Schließlich wird die Flasche noch zweimal mit 20 ml dest. Wasser sorgfältig nachgespült und die Waschwässer werden mit der Lösung in der Schale vereinigt. Es wird nun in einen 100- oder 250-ml-Meßkolben filtriert und die fehlende Flüssigkeit mit dest. Wasser ergänzt.

Bevor man diese Lösungen wie auch die des Mikrobombenaufschlusses weiter verarbeitet, ist es zu empfehlen, zu Beginn eines Arbeitstages die Apparatur mit einer Testanalyse zu überprüfen. Dazu benutzt man eine Kaliumsulfat-Standardlösung, die in 2 ml etwa 30 γ Schwefel enthält. In das sorgfältig gereinigte Rundkölbchen werden 2 ml der Standardlösung pipettiert. Zur Verdunstung des Wassers wird das Kölbchen in ein kochendes Wasserbad gebracht und ein schwacher Luftstrom hineingeblasen. Nachdem man das Kölbchen an die Apparatur angeschlossen hat, wird der Schliff mit Hilfe von Stahlfedern gesichert. Sobald man das mit 20 ml Absorptionslösung beschickte Meßkölbchen von 50 ml Inhalt so unter das Ende des Gaseinleitungsrohres gebracht hat, daß dessen Spitze den Boden des Kölbchens berührt, wird der Wasserstoffstrom auf rasche Blasenfolge in der Absorptionslösung eingestellt. Nachdem man 2 Minuten den Wasserstoff durch die Apparatur geleitet hat, schließt man den Glashahn des Gaszuleitungsrohrens, entfernt den Schliff vom graduierten Meßzylinder und bringt in diesen aus der Vorratsflasche 2 ml des Reduktionsgemisches. Sodann setzt man den Schliff wieder auf und öffnet den Glashahn. Durch den nachströmenden Wasserstoff wird das Reduktionsgemisch in das Rundkölbchen gedrückt. Nun setzt man den Rückflußkühler in Betrieb und bringt unter das Kölbchen einen Brenner mit kleiner Flamme und Schornstein. 15 Minuten nach Beginn des Siedens senkt man die Vorlage, zieht die Spitze aus der Gummiverbindung und läßt sie vorsichtig in das Kölbchen zur Absorptionslösung gleiten. Damit der Schliff bis zur nächsten Destillation abgekühlt ist, entfernt man den Brenner unter dem Kölbchen.

Für die Methylenblaureaktion wird die Vorlage auf Leitungswassertemperatur gekühlt. Nach Hinzufügen von 7,5 ml Dimethyl-p-phenylen-diaminlösung setzt man den Glasstopfen auf und schwenkt einmal um. Schließlich fügt man noch rasch 2 ml der Eisenalaunlösung hinzu, verschließt das Kölbchen und stellt es unter kreisförmigem Umschwenken

zur Farbentwicklung ab. Dabei geht die zuerst auftretende Rotfärbung über Violett in Blau über, dessen Farbe nach 15 Minuten über mehrere Stunden beständig bleibt. Vor dem Ablesen der Extinktion holt man mit einer Pinzette die Glasspitze aus der Lösung, spült sie im Kolben-

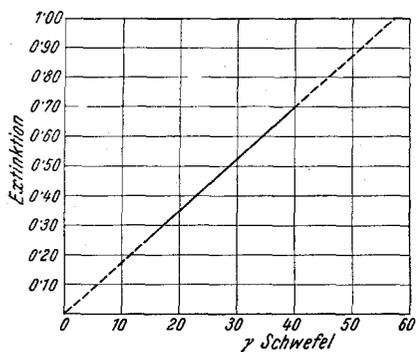


Abb. 2. Extinktionskurve für Methyleneblau
(V = 50 ml, F = „S 66“ 1-cm-Küvette).

hals vorsichtig ab, fügt noch 1 ml Methylalkohol hinzu, ergänzt mit dest. Wasser bis zur Marke und schüttelt gut durch. Die Ablesung der Extinktion wird im Stufenphotometer (Zeiss) unter Benutzung des Filters „S 66“ in der 1-cm-Küvette gegen Wasser vorgenommen. Aus der in Abb. 2 gebrachten Extinktionskurve ergeben sich die den abgelesenen Extinktionswerten entsprechenden γ Schwefel. Hat die Testanalyse gezeigt, daß Apparatur und Reagenzien in Ordnung sind,

kann sofort mit der Analyse der Untersuchungslösung begonnen werden. Von den Probelösungen bringt man im allgemeinen die etwa 30 γ Schwefel entsprechende Menge in das Rundkölbchen und verfährt nach Eindunsten zur Trockne weiter, wie bereits für die Testanalysen beschrieben wurde.

Tabelle 2. Beleganalysen und Anwendungsbeispiele.

Analysenprobe	Ber. % S	Gef. % S nach		Gef. % S nach Mikromethode Zimmermann
		Verfahren A	Verfahren B	
Chininsulfat + 8 H ₂ O	3,59	3,50 3,38	3,52	—
Natriumrhodanid	27,37	27,21	—	—
Methionin	21,50	21,42 21,78	21,51	—
Cystin	26,69	26,66 26,14	26,85	—
Cysteinhydrochlorid	20,34	20,23	—	—
Aneurinhydrochlorid	9,49	9,58	9,32	—
Casein	—	0,75	0,75 0,76	0,78
Eialbumin	—	1,52	1,50 1,52	1,48
Gliadin	—	0,99	—	1,00
Edestin	—	0,60	0,61	0,63
Weizenschrot	—	0,135	—	0,145*

* Mittelwert. Der Aufschluß ist wegen der großen Substanz- und Kaliummenge gefährlich.

Fortsetzung der Tabelle 2.

Analysenprobe	Ber. % S	Gef. % S nach		Gef. % S nach Mikromethode Zimmermann
		Verfahren A	Verfahren B	
Weizenhydrolysat, Frakt. I	—	0,051	—	—
„ „ „ II	—	0,056	—	—
Kälberblut	—	—	0,072/100 ml	—
Kälberblutserum	—	—	0,055/100 ml	—
Tagesharn	—	0,094/100 ml	0,091/100 ml	—
HCl-Auszug aus alkalischem Sandboden	—	—	0,0187	—
Sickerwasser aus alkalischem Sandboden	—	—	0,009	—
Leitungswasser	—	0,00135	—	—
		0,00136		

Für die Unterstützung bei den methodischen Arbeiten sei den Herren *W. Beck* und *E. Diehl* bestens gedankt.

Zusammenfassung.

Es wird über eine Methode zur Bestimmung kleinster Mengen Schwefel in beliebigem Untersuchungsmaterial berichtet. Sie beruht auf folgendem Prinzip: Je nach der Art der Untersuchungsprobe wird deren Schwefel jeder Bindungsart in einem Mikrobombenrohr oder durch Verbrennung in einer mit Sauerstoff gefüllten Flasche zu Sulfat oxydiert. Nach Reduktion des Sulfats mit einem Jodwasserstoff-Ameisensäure-Gemisch zu Schwefelwasserstoff wird der in einem Wasserstoffstrom übertriebene Schwefelwasserstoff in einer Zinkacetatlösung zu Zinksulfid umgesetzt, aus dem er nach Ansäuern frei gemacht und als Methylenblau photometrisch bestimmt wird.

Obleich eine Verfeinerung des Verfahrens möglich ist, wurde es vorläufig zur Bestimmung von 10 bis 40 γ Schwefel ausgearbeitet, denn in diesem Bereich hat es sich auch als Serienmethode bereits bewährt. Die Methode, die man zur Analyse von Proben, deren Schwefelgehalt einige Zehntelprocente und weniger beträgt, heranziehen wird, kann gewissermaßen als eine ergänzende Erweiterung der üblichen Mikrobestimmung in das Ultramikrogebiet (Mikrogramme) angesehen werden. Wir verwenden sie besonders zum quantitativen Nachweis von Schwefelspuren, für die Bestimmung schwefelhaltiger Substanzen in physiologischem Material und zur Analyse von Bodenauszügen und Wässern. Für Untersuchungsproben mit einem Schwefelgehalt unter 1% beträgt die Genauigkeit der beschriebenen Methode 3% (absolut).

Summary.

A method is reported for the determination of very small amounts of sulfur in any kind of material. The underlying principle is as follows: According

to the nature of the sample, its sulfur, no matter what the type of linkage, is oxydized to sulfate in a micro bomb tube or by combustion in a flask filled with oxygen. After reduction of the sulfate in a hydriodic acid — formic acid mixture, the resulting hydrogen sulfide is carried by a steam of hydrogen into a zinc acetate solution. The zinc sulfide is decomposed with acid and the hydrogen sulfide is determined photometrically as methylene blue.

Although it is possible to refine the method, it was developed for the present as a means of determining 10—40 γ sulfur, since it has already proved very useful in this range as a series method also. The method, which can be called on for the analysis of samples, whose sulfure content amounts to several tenths of a percent and less, can be regarded to some extent as an extension of the usual micro-determination into the ultra-micro range (micrograms). The author use it especially for the quantitative detection of traces of sulfur, for the determination of sulfur-bearing substances in physiological material, and for the analysis of soil extracts and waters.

Résumé.

On donne une méthode de dosage de très petites quantités de soufre dans une substance quelconque. Elle repose sur le principe suivant: D'après la nature de l'échantillon en expérience, le soufre, quel que soit son mode de liaison, est oxydé en sulfate dans un microtube scellé ou un flacon rempli d'oxygène. Après réduction du sulfate dans un mélange acide iodhydrique-acide formique, l'hydrogène sulfuré formé est entraîné par un courant d'hydrogène dans une solution d'acétate de zinc et transformé en sulfure de zinc. Le soufre contenu est libéré par acidification et dosé colorimétriquement sous forme de bleu de méthylène.

Quoique une amélioration du procédé soit possible, on l'a élaboré provisoirement pour un dosage de 10 à 40 γ de soufre; alors, dans ce domaine, il a déjà servi pour le dosage en série. La méthode que l'on a adoptée pour l'analyse des échantillons dont la teneur en soufre s'élève à quelques dixièmes pour cent et même moins, peut, en quelque sorte, être considérée comme un complément du microdosage déjà utilisé dans le domaine ultramicro (microgramme). Nous l'employons particulièrement pour la recherche quantitative de traces de soufre, pour le dosage de substances sulfurées dans le matériel physiologique et pour l'analyse des extraits de terres et d'eaux minérales.

Literatur.

- ¹ R. Lucas und Fr. Grassner, Mikrochem. 6, 116 (1928). — W. Leithe, Mikrochem. 33, 176 (1947). — W. G. Klimentko, Biochimia 14, 1 (1949).
- ² F. Emich und J. Donau, Monatsh. Chem. 30, 745 (1909).
- ³ O. Wehner, Verband deutscher Landw. Versuchsanstalten, Methodenbuch, Bd. IV, J. Neumann, Neudamm und Berlin, 1941, S. 32.
- ⁴ St. Lorant, Z. physiol. Chem. 185, 245 (1929).
- ⁵ W. Zimmermann, Mikrochem. 31, 15 (1944); 33, 122 (1947); 35, 80 (1950).
- ⁶ W. Grote und H. Krekeler, Z. angew. Chem. 46, 106 (1933).
- ⁷ G. Kortüm, Die chem. Technik 15, 167 (1942).
- ⁸ E. Abrahamczik, Z. angew. Chem. 55, 233 (1942).
- ⁹ F. Pregl, Quantitative organische Mikroanalyse, 6. Auflage, neubearbeitet von Dr. H. Roth, Springer-Verlag Wien. 1949. S. 131.
- ¹⁰ A. Bernthsen, Ann. Chem. 230, 73 (1885).