

das in pathologischen Fragen mit uns zusammen arbeitet. Dort stellte Prof. Dobberstein²⁶⁾ fest, daß neben anderen Organveränderungen eine ganz spezifische Form des Leberzerfalls vorliegt, ähnlich dem bei der Eklampsie der schwangeren Frau. Diese Beobachtung ist inzwischen immer wieder an den mit Hefeeiweiß oder anderem cystinarmen Eiweiß aufgezogenen Ratten gemacht worden. Es liegen bisher rd. 200 Sektionsbefunde vor; bei ~80% der verendeten Tiere mußte dieser charakteristische Leberzerfall als Todesursache angenommen werden.

Bei den mit Hefeeiweiß + 2% Cystin aufgezogenen Tieren traten diese Leberveränderungen nicht auf, Cystin verhindert somit sowohl das Kümmerwachstum als auch die beschriebenen spezifischen Ausfallserscheinungen. Ähnliche Erscheinungen bei der Fütterung mit anderen cystin-armen Eiweißkörpern, auch tierischer Herkunft, entlasten die Hefe von dem Vorwurf, daß speziell nur ihr Eiweiß die beobachteten Schäden auslöse.

Bezüglich des Mechanismus der Cystin-Wirkung sind wir bisher noch auf Vermutungen angewiesen. Einige diesbezügliche Arbeitshypothesen sind in unseren Originalarbeiten^{23, 26)} ausgesprochen worden.

Unsere neuartigen Befunde über die Wirkung des Cystins veranlaßten uns unlängst, für unsere weiteren Versuche die Arbeitshypothese auszusprechen, daß nicht nur bei Mangel an Cystin, sondern auch bei Mangel an anderen lebensnotwendigen Aminosäuren spezifische Ausfallserscheinungen ausgelöst werden, ähnlich denen, wie sie bisher bei Mangel an Vitaminen beobachtet worden sind.

Ganz ähnliche Befunde wurden auch bei dem Eiweiß von Schimmelpilzmycel erhalten. Untersucht wurde bisher besonders der im ostasiatischen Gärungs- und Nahrungsmittelgewerbe seit mehreren tausend Jahren gebräuchliche Reisschimmel *Aspergillus oryzae*. Bei einigen wenigen Versuchen damit, die noch erweitert werden müssen, war das Wachstum der Ratten als Gradmesser für den physiologischen Wert dieses Schimmelpilzeiweißes sogar etwas günstiger als bei Hefeeiweiß. Die Steigerung durch Cystin war aber weniger ausgeprägt. Auch hier traten die spezifischen Ausfallserscheinungen auf.

Da es nicht erwiesen ist, daß in unserer Kriegernährung das an und für sich wenige tierische Eiweiß oder anderes pflanzliches Eiweiß²⁷⁾ die Komplettierung des Hefeeiweißes durchführen kann, wäre an eine Ergänzung der fehlenden Aminosäure zu denken.

Hier liegen die Verhältnisse insofern günstig, als unter den lebenswichtigen Aminosäuren das Cystin relativ leicht zu-

gänglich ist. Es findet sich besonders reichlich in den Gerüst-eiweißkörpern oder Skleroproteiden, besonders in den Kärtinen und Pseudokeratinen wie Haaren, Wolle, Horn usw. und könnte am einfachsten durch geeignete Säurehydrolyse aufgeschlossen werden.

| | % | | % |
|----------------|-----------|------------------|---------|
| Haare | 8,9—15,5 | Federn | 6,8 |
| Wolle | 11,9—13,1 | Schildpatt | 8,6 |
| Horn | 8,2—8,7 | Waalborsten ... | 9,5 |
| Nägel | 12,0 | Haut | 3,8 |
| Stacheln | 9,4 | Hefe | 0,3—1,5 |

Tabelle 2. Cystin-Gehalt verschiedener Keratine²⁸⁾.

Auf den ersten Blick mag die schon früher vorgeschlagene Verwendung derartiger natürlicher Cystin-Quellen zu Ernährungszwecken, in unserem Fall zur Aufwertung des Hefeiweißes, ungewöhnlich erscheinen. Keratinhydrolysate haben aber seit einiger Zeit sowohl in der Therapie z. B. in Form des Detoxins der Firma Wülfing als auch in der Diätetik und besonders in der Fütterungspraxis Eingang gefunden. So dürfen z. B. Hornhydrolysate nach dem Nahrungsmittelgesetz seit 1936 zur Herstellung von Suppenwürzen verwendet werden. Weiterhin sind vor allem in der amerikanischen Fütterungspraxis mit der Beifütterung von Keratinhydrolysaten besonders bei Schweinen gute Ergebnisse erzielt worden.

Da der größte Teil der Bierhefe und besonders auch der aus Zellstoffablaugen, Vorhydrolysaten und Holzzucker gewonnenen Hefe künftig mehr und mehr in Form von Hefextrakten, Hefepasten, Brotaufstrichen, Hefewürzen in den Handel kommen wird, dürfte auch das Zufügen der nur geringen Mengen von Cystin- oder cystin-reichen Keratin-Aufschlüssen technisch keine nennenswerten Schwierigkeiten machen.

Der einfachste Weg wäre natürlich, eine mit physiologisch vollwertigem Eiweiß ausgestattete cystin-reichere Hefe zu züchten. Versuche in dieser Richtung sind in unserem Laboratorium im Gange. Es ist gemeinsam mit Fr. Dr. Schlie bisher gelungen, den Gehalt an organischem Schwefel in der Hefe zu verdoppeln. Aber auch eine rein chemisch-industrielle Synthese dürfte, soweit sie das Cystin oder Methionin zu entsprechenden Preisen zur Verfügung stellen könnte, nach den durch unsere Arbeiten eröffneten Aussichten lohnend sein.

Jedenfalls sind durch diese Versuche neue Möglichkeiten und gangbare Wege aufgezeigt, wie man das biologisch unterwertige Hefeeiweiß zu biologisch vollwertigem Eiweiß aufwerten kann.

Eingeg. 21. Februar 1944. [A. 27.]

²⁶⁾ Dobberstein u. Hock, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 280, 21 [1943].

²⁷⁾ Diesbezügliche Versuche mit verschiedenen Pflanzeneiweißen sind im Gange.

²⁸⁾ Block, J. biol. Chemistry 127, 685 [1939]; 128, 181 [1939].

Analytisch-technische Untersuchungen

Eine neue photometrische Methode zur Phosphorsäure-Bestimmung

Von Prof. Dr. G. KORTÜM, Dr. M. KORTÜM-SEILER und B. FINCKH.

Physikalisch-chemisches Institut der Universität Tübingen.

I. Messprinzip.

Das Prinzip der Methode beruht auf der lange bekannten Tatsache, daß Phosphat-Ionen in Lösung mit Eisen(III)-Ionen Komplexe bilden. Die Phosphorsäure stört deshalb bei einer Reihe von Eisen-Bestimmungen insofern, als sie die Bildung anderer Eisen-Komplexe teilweise verhindert. Z. B. kann eine Eisen(III)-rhodanid-Lösung unter geeigneten Bedingungen durch Phosphorsäure praktisch entfärbt werden¹⁾. Ähnlich wirkt Phosphorsäure auch auf andere farbige Eisen-Verbindungen. Aus der Abnahme der Farbtensität einer solchen Eisen-Verbindung kann daher umgekehrt auf die Menge der zugesetzten Phosphat-Ionen geschlossen werden. Je lockerer die betreffende farbige Eisen-Verbindung ist, um so leichter wird ihr Gleichgewicht zugunsten der Bildung des Eisen-phosphat-Komplexes verschoben, um so stärker wirkt sich also ein bestimmter Phosphorsäure-Zusatz aus. Da die Liganden im Eisenphosphat-Komplex an und für sich schon schwach gebunden sind, sollte die farbige Eisen-Verbindung nach Möglichkeit lockerer sein. Andererseits soll die Farbe möglichst stabil, d. h. zeitlich konstant sein, was bei der Eisenrhodanid-Färbung nicht der Fall ist. Dagegen bilden Eisen(III)-Ionen mit Salicylat-Ionen in saurer Lösung eine violette

Komplexverbindung, deren Farbe zeitlich konstant und sehr phosphorsäure-empfindlich ist. Unter geeigneten Versuchsbedingungen nimmt die Farbtensität der Eisen(III)-salicylat-Verbindung bei Zugabe der zweifach äquivalenten Phosphat-Menge (bezogen auf die Eisen(III)-Konzentration) um mehr als 50% ab; sie ist sofort nach Herstellung der Lösung konstant und bleibt tagelang unverändert. Mit Hilfe einer Eichkurve kann somit aus der Farbtensität einer Eisen(III)-salicylat-Lösung bekannter Konzentration die Phosphat-Konzentration ermittelt werden.

II. Allgemeine Versuchsbedingungen.

Die beschriebene Methode ist nur unter Einhaltung bestimmter Versuchsbedingungen, d. h. in einem bestimmten pH-Bereich und unter bestimmten Konzentrationsverhältnissen anwendbar. Für die Wahl dieser Bedingungen sind folgende Gesichtspunkte maßgebend:

a) Die Geschwindigkeit der Bildung des Eisenphosphat-Komplexes ist pH-abhängig. Die Gleichgewichtseinstellung erfolgt nur unterhalb von $\text{pH} \sim 2$ momentan. Schon bei $\text{pH} = 2,7$ stellt sich auch innerhalb von 24 h kein Gleichgewicht ein. Es wäre aus diesem Grunde erwünscht, die Messungen in möglichst saurem Medium durchzuführen.

¹⁾ R. F. Weinland u. F. Enzgraber, Z. anorg. allg. Chem. 84, 349 [1913].

b) Andererseits ist auch die Farbintensität der violetten Eisensalicylsäure-Verbindung pH-abhängig. Ein Maximum der Intensität tritt bei $\text{pH} \sim 2,7$ auf. In stark saurer Lösung verblaßt die Farbe vollständig. Offenbar ist die Farbe an das Vorhandensein von Salicylat-Ionen gebunden, deren Konzentration in stark saurer Lösung praktisch völlig zugunsten von undissoziierter Salicylsäure zurückgedrängt wird. Eine starke pH-Abhängigkeit der Extinktion ist für die Messungen unerwünscht, da in diesem Fall das pH der Lösung sehr exakt definiert sein muß. Am kleinsten ist diese pH-Abhängigkeit naturgemäß im Maximum der Extinktion, also bei $\text{pH} \sim 2,7$. Um eine momentane Gleichgewichtseinstellung des Eisenphosphat-Komplexes zu erreichen, darf man jedoch ein pH von höchstens 2 wählen, wobei die kleinere Farbintensität und die größere pH-Empfindlichkeit der Extinktion in Kauf genommen werden müssen. Auch die Empfindlichkeit der Phosphat-Bestimmung, d. h. die prozentuale Abnahme der Extinktion der Eisensalicylat-Verbindung bei Zugabe einer bestimmten Menge Phosphat ist bei $\text{pH} = 2$ etwas kleiner als bei $\text{pH} = 2,7$. Der Vorteil der momentanen Gleichgewichtseinstellung bei relativ niedrigem pH muß also mit dem Nachteil der geringeren Empfindlichkeit und größeren pH-Abhängigkeit erkauft werden.

c) Für die Empfindlichkeit der Methode maßgebend sind ferner die Konzentrationsverhältnisse von Eisen(III)-Ionen, Salicylat-Ionen und von einigen spezifisch wirkenden Anionen und Kationen. Ganz allgemein ist die Empfindlichkeit am größten bei möglichst kleinen und möglichst äquimolaren Konzentrationen an Eisen(III)-salz und Salicylat-Ionen. Die untere Grenze der Konzentration ist dadurch gegeben, daß eine noch gut meßbare Extinktionsänderung bei der Phosphatzugabe erzielt werden muß.

Bei der folgenden Arbeitsvorschrift verwendet man in der Meßlösung folgende Konzentrationen: Eisen(III)-salz und Salicylat je $2 \cdot 10^{-4}$ m, Phosphatzusatz bis $4 \cdot 10^{-4}$ m. Die Extinktion der Lösung ohne Phosphatzusatz beträgt bei einer Schichtdicke von 4 cm im grünen Spektralbereich 0,8, bei Gegenwart von $4 \cdot 10^{-4}$ m Phosphat 0,38. Die gesamte Extinktionsabnahme beträgt also 0,42. Eine solche Extinktion bzw. Extinktionsabnahme entspricht ungefähr dem optimalen Meßbereich der üblichen Absorptionsmeßgeräte. Die Zugabe größerer Mengen Phosphats ist zu vermeiden, da dann die relative Extinktionsänderung kleiner wird und außerdem die Gleichgewichtseinstellung nicht mehr momentan erfolgt.

Auch eine Reihe von spezifisch wirkenden Anionen und Kationen spielt sowohl für die Extinktion der Eisensalicylat-Verbindung als auch für die prozentuale Abnahme dieser Extinktion bei Phosphatzugabe, d. h. also für die Empfindlichkeit der Methode eine Rolle. Es ist leicht einzusehen, daß Anionen, die mit dem Eisen- oder mit dem Salicylat-Ion komplexe Verbindungen bilden, in dieser Richtung wirken müssen. Quantitative Daten über die Fremdionenwirkung sind aus der Abb. 3 über Fremdzusätze zu ersehen. Hier sei nur hervorgehoben, daß besonders Sulfat-Ionen eine starke Extinktionsabnahme bewirken, woraus sich ergibt, daß zum Ansäuern der Meßlösung nur HCl, HNO₃ oder HClO₄ verwendet werden darf.

Auch die Verwendung gepufferter Meßlösungen scheitert daran, daß die meistens für diesen pH-Bereich in Frage kommenden Puffer (Oxalsäure-, Glykokoll-, Weinsäure-, Milchsäure- und Biphthalat-Puffer) infolge ihrer Neigung zu Komplexbildungen die Extinktion des Eisensalicylat-Komplexes und damit die Empfindlichkeit der Methode stark verkleinern. Geeignet wären Puffer aus den verschiedenen Chloressigsäuren und ihren Natriumsalzen. Doch kann man dann gelegentlich die Phosphat-Bestimmung nicht reproduzieren, was vermutlich mit der Hydrolyse der Chloressigsäure zusammenhängt. Die Geschwindigkeit der Hydrolyse wird vor allem photochemisch beschleunigt. Ein Essigsäure-Natriumacetat-Puffer ist nicht verwendbar, da das pH nicht genügend klein für eine momentane Gleichgewichtseinstellung ist. Bei sehr großem Säureüberschüß (1 n in der Meßlösung) wird ebenfalls die Extinktion und damit die Empfindlichkeit der Methode stark herabgesetzt. Das gleiche gilt für Ameisensäure-Formiat-Puffer. Bekanntlich bilden sowohl Ameisensäure als auch Essigsäure mit Eisen-Ionen Komplexverbindungen, was ihre nachteilige Wirkung erklärt, wenn sie in hohen Konzentrationen vorhanden sind.

Am vorteilhaftesten erweist sich somit die pH-Einstellung der Meßlösung mittels HCl oder HNO₃. Das pH unbekannter Lösungen muß unter Zugabe eines Indicators mit verdünnter Salzsäure oder Natronlauge eingestellt werden. Als Indicator eignet sich am besten β-Dinitro-phenol, das im blauen

Spektralbereich absorbiert und somit die Absorptionsmessung im Grün nicht stört. Der Fehler in der Phosphat-Bestimmung, der durch geringe Schwankungen in der pH-Einstellung der unbekannten Lösung entsteht, ist bei Verwendung von salzsauren Lösungen nur etwa doppelt so groß wie bei den best gepufferten Lösungen.

III. Leistungsfähigkeit der Methode.

a) Empfindlichkeit und Genauigkeit der Bestimmung.

Zur Phosphat-Bestimmung wird eine Eichkurve aufgestellt, d. h. es wird die Extinktion einer Eisensalicylat-Lösung bestimmter Konzentration (je $2 \cdot 10^{-4}$ m) und vom $\text{pH} = 2$ in Abhängigkeit von der Konzentration des anwesenden Phosphats aufgetragen. Umgekehrt kann dann mit Hilfe der Eichkurve die Konzentration unbekannter Phosphat-Lösungen bestimmt werden.

Die Eichkurven der Abb. 1 wurden mit dem lichtelektrischen Spektralphotometer der Firma Bühler²⁾ bei 25 und 34°

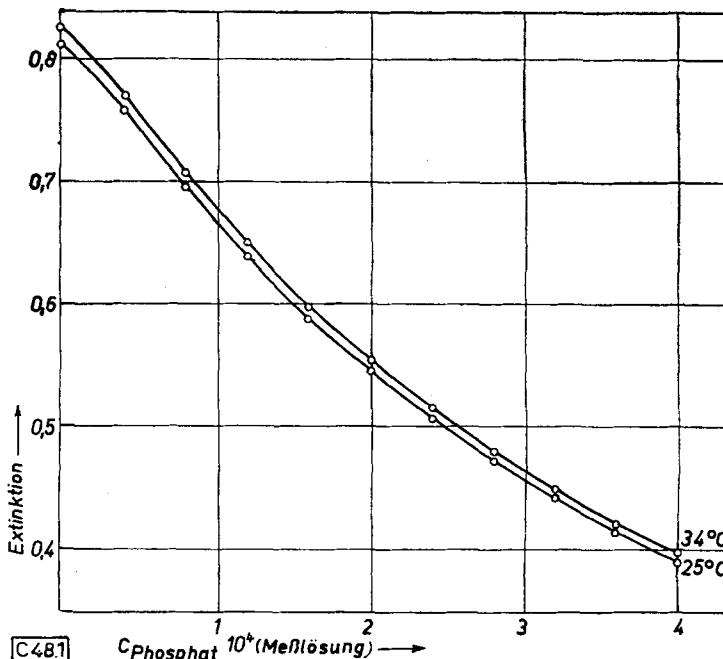


Abb. 1. Eichkurve bei 2 Temperaturen (25 und 34°).

$$\begin{aligned} c_{\text{Eisenchlorid}} &= 2 \cdot 10^{-4} \text{ Mol/l} \\ c_{\text{Salicylat}} &= 2 \cdot 10^{-4} \text{ Mol/l} \\ c_{\text{HCl}} &= 0,01 \text{ Mol/l} \end{aligned}$$

mit kontinuierlicher Lichtquelle und einem Grünfilter (Schottfilter VG 9) aufgenommen. Wie aus Abb. 2 zu ersehen ist,

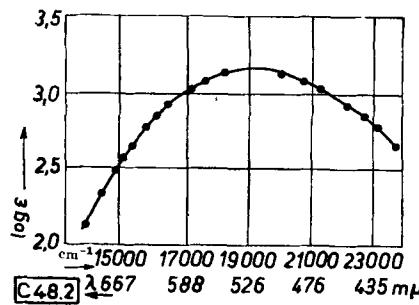


Abb. 2. Lichtabsorption des Eisensalicylat-Komplexes bei $\text{pH} \sim 2,8$.

$$c_{\text{Eisenchlorid}} = c_{\text{Natriumsalicylat}} = 2 \cdot 10^{-4} \text{ Mol/l}$$

liegt das Maximum der Lichtabsorption des Eisensalicylat-Komplexes bei $\lambda \sim 550 \text{ m}\mu$. Der Schwerpunkt des verwendeten Filters liegt ungefähr bei der gleichen Wellenlänge.

Die gesamte Extinktionsabnahme bei Gegenwart von $4 \cdot 10^{-4}$ m Phosphat beträgt 0,42. Da die Eichkurve nur schwach gekrümmmt ist, ist die Empfindlichkeit der Bestimmungsmethode über den ganzen Meßbereich angenähert konstant. Die relative Genauigkeit der Phosphat-Bestimmung (zufällige Fehler bzw. Streuung) ist durch die Genauigkeit gegeben, mit der man die Extinktionsänderung bestimmen kann; sie hängt

²⁾ Vgl. chem. Techn. 15, 167 [1942].

also vom Meßverfahren ab und ist bei kleinen Phosphat-Gehalten naturgemäß geringer als bei größeren Phosphat-Konzentrationen. Auch bei Phosphat-Gehalten $> 4 \cdot 10^{-4} \text{ mol/l}$ nimmt die Genauigkeit wieder ab, da die Eichkurve immer flacher wird. Bei der verwendeten Eisen(III)-Salz- und Natriumsalicylat-Konzentration von je $2 \cdot 10^{-4} \text{ mol/l}$ liegt der günstigste Phosphat-Konzentrationsbereich zwischen 2 und $4 \cdot 10^{-4} \text{ mol/l}$ in der Meßlösung. Bei dem hier verwendeten Meßverfahren betrug die Streuung (der mittlere Fehler der Einzelmessung) $0,1\text{--}0,2\%$.

Die Temperaturabhängigkeit der Eichkurve ist sehr gering. Einer Temperaturänderung von 10°C entspricht eine Extinktionsänderung von etwa 2% (vgl. Abb. 1).

b) Richtigkeit der Messung (Systematische Fehler).

Die Richtigkeit der Messung wird beeinträchtigt durch Fehler in der pH-Einstellung und durch u. U. vorhandene Fremdsalze.

1. pH-Einstellung. Der Extinktionsunterschied, der durch eine Änderung des pH der Lösung entsteht, beträgt 1% bei einer Änderung der Wasserstoff-Ionenkonzentration von 5%. Dieser Wert gilt für Lösungen mit und ohne Phosphat-Zusatz. Das bedeutet, daß der relative Fehler in der Phosphat-Bestimmung bei kleinen Extinktionsdifferenzen gegenüber der phosphat-freien Lösung u. U. sehr groß werden kann. Beträgt die Phosphat-Konzentration das Doppelte der Eisensalicylat-Konzentration, so wird die Extinktion um 50% herabgesetzt (vgl. Eichkurve); dann beträgt der oben angegebene Fehler von 1% auf den Extinktionsunterschied bezogenen ebenfalls 1%. Wird die Extinktion nur um 35% herabgesetzt ($c_{\text{Phosphat}} = c_{\text{Eisensalicylat}}$), beträgt er bereits das Doppelte. Unter Verwendung von β -Dinitro-phenol als Indicator läßt sich die Wasserstoff-Ionenkonzentration einer unbekannten Lösung leicht auf 5% genau einstellen. Wird dann eine Genauigkeit von mindestens 2% in der Phosphat-Bestimmung gewünscht, darf also die Konzentration an Phosphat nicht kleiner als diejenige von Eisensalicylat sein. Um dieser Bedingung zu genügen, muß die Eichkurve mit kleineren Eisensalicylat-Konzentrationen aufgestellt werden, wenn es sich um die Bestimmung sehr kleiner Phosphat-Mengen handelt.

2. Der Einfluß von Fremdsalzzusätzen auf die Ergebnisse läßt sich am besten an Hand der Abb. 3 übersehen. Darin ist so-

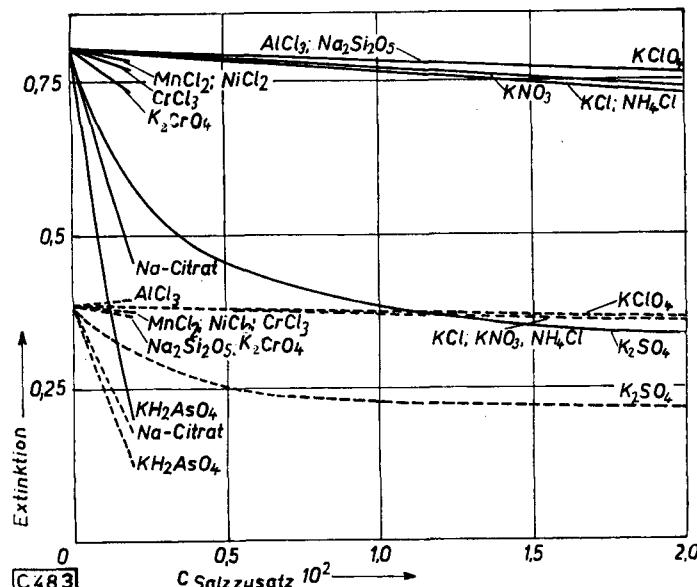


Abb. 3. Salzeinflüsse auf die Extinktion des Eisensalicylat-Komplexes. Oben ohne Phosphat-Zusatz, unten mit Phosphat-Zusatz ($4 \cdot 10^{-4} \text{ mol/l}$).

$$\begin{aligned} \text{c Eisen(III)-chlorid (Meßlösung)} &= 2 \cdot 10^{-4} \text{ mol/l} \\ \text{c Na-Salicylat (Meßlösung)} &= 2 \cdot 10^{-4} \text{ mol/l} \\ \text{c HCl (Meßlösung)} &= 0,01 \text{ mol/l} \end{aligned}$$

wohl der Einfluß auf die Farbe des reinen Eisensalicylat-Komplexes als auch auf die Farbe des Komplexes bei Phosphat-Zusatz eingezeichnet. Der Einfluß der Neutralsalze KClO_4 , KNO_3 , KCl , NH_4Cl ist bis zu einem 100fachen Überschuß, bezogen auf die Phosphat-Konzentration, diejenige der übrigen Salze bis zum 10fachen Überschuß untersucht. Bei Salzen, die im Sichtbaren absorbieren, wurde die Vergleichslösung mit der gleichen Salzmenge versetzt. Aus der Ähnlichkeit der beiden Kurvenbilder ist zu erkennen, daß es sich bei den Salzeffekten zur Hauptsache um eine Gleichgewichtsverschiebung des Eisensalicylat-Komplexes und nicht um eine solche des Eisenphosphat-Komplexes handelt. Man hat zwischen allgemeinen und spezifischen Salzeinflüssen zu unterscheiden. Die letzteren, zu denen Sulfat-, Citrat-

und Arsenat-Ionen gehören, sind so stark, daß die Gegenwart dieser Ionen bei einer Phosphat-Bestimmung unbedingt vermieden werden muß. Die übrigen untersuchten Salze (KCl , NH_4Cl , KNO_3 , AlCl_3 , Na_2SiO_3 , MnCl_2 , NiCl_2 , CrCl_3 und K_2CrO_4) bewirken Fehler von weniger als 1% in der Phosphat-Bestimmung, sofern sie in äquivalenten Mengen zum Phosphat vorhanden sind. Bei großem Überschuß an solchen Salzen können auch Fehler von einigen Prozenten auftreten. Dabei scheint es sich im wesentlichen um eine Wirkung der Anionen zu handeln, da die Salzeffekte unabhängig von der Art des anwesenden Kations sind. Hervorzuheben ist die geringe Wirkung von Silicat-Zusätzen, die beim Molybdänblau-Reagens in viel größerem Maße stört. Ist also Kieselsäure unbekannter Menge in der Versuchssubstanz vorhanden, ist die neue Methode der Molybdän-Methode durchaus vorzuziehen.

Möglicherweise enthält bereits die Analysenlösung Eisen(III)-Ionen. Dann gibt man entsprechend weniger Eisenchlorid in Form von Reagenslösung zu, während die Salicylsäure-Menge jedoch konstant bleibt. Die Eisen(III)-Ionenkonzentration der Analysenlösung muß dann vorher mit Hilfe einer phosphorsäure-unempfindlichen Methode (z. B. nach vorheriger Reduktion als Eisen(II)-komplex mit o-Phenanthrolin oder Dipyrindyl) bestimmt werden. Sind Eisensalze, bezogen auf Phosphorsäure, im Überschuß vorhanden, wie bei der Phosphor-Bestimmung in Stählen, so muß das Eisen vorher entfernt werden. Dafür bestehen zwei Möglichkeiten, wobei gleichzeitig auch andere störende Kationen abgetrennt werden.

c) Entfernung von Schwermetallkationen durch Basenaustauscher.

Die Abtrennung des Eisens als Hydroxyd in alkalischer Lösung ist nicht möglich, da Eisenphosphat schon bei einem $\text{pH} \sim 3$ ausfällt. Auch das Ausäthern des Eisenchlorids aus konzentriert salzsaurer Lösung beeinträchtigt die Genauigkeit der Phosphat-Bestimmung, wie wir feststellten, beträchtlich. Es wurde deshalb zunächst versucht, die Eisen(III)-Ionen mit Hilfe der neuerdings entwickelten synthetischen Basenaustauscher quantitativ zu entfernen. Derartige Austauscher sind bereits mehrfach für analytische Zwecke herangezogen worden³. In Frage kamen im wesentlichen die säurebeständigen Austauscher auf Harzbasis, die unter dem Namen „Wofatite“ hergestellt werden⁴. Die Wirkungsweise der Austauscher besteht darin, daß sie die Protonen der Säuregruppe gegen Kationen der Lösung bis zur Erreichung eines Gleichgewichts austauschen können⁵. Am leichtesten werden mehrwertige Kationen aufgenommen, so daß die Entfernung von Eisen(III)-Ionen verhältnismäßig leicht erfolgen sollte. Durch Behandlung mit konzentrierter Salzsäure können die Austauscher nachträglich wieder regeneriert werden.

Man läßt den Wofatit zunächst über Nacht quellen, behandelt einige Male mit 2 n HCl und wäscht sorgfältig mit destilliertem Wasser aus. Wenn man die Austauschlösung ($\text{pH} \sim 1$) mit Wofatit zusammen röhrt bzw. die Lösung durch eine Wofatitschicht laufen läßt, so zeigt sie nachträglich stets eine merkliche, auch durch Filtration mit Hartfiltern nicht vollständig entfernbare Trübung, die aus feinsten Wofatiteilchen besteht und die photometrische Messung empfindlich stört. Diese Trübung läßt sich vollständig vermeiden, wenn man die Lösung von unten her durch eine Wofatitschicht und ein darüber befindliches, etwa 3 cm dickes Wattefilter hindurchdrückt (vgl. Abb. 4). Die Durchflußgeschwindigkeit wird mit einem Dreiegelnahmereguliert und soll etwa $4\text{--}5 \text{ cm}^3/\text{min}$ betragen. Vor dem Einfüllen des Wofatits muß das Rohr mit Wasser gefüllt sein, da sonst leicht Luftpolster entstehen, die die vollständige Benetzung des Wofatits mit der Austauschlösung verhindern. Man verwirft die ersten Anteile der überfließenden Lösung ($\sim 80 \text{ cm}^3$) bei den in der Zeichnung angegebenen Rohr-

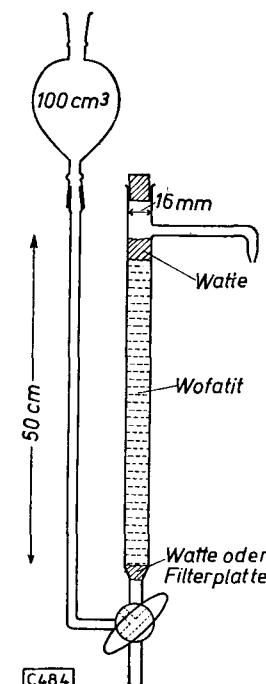


Abb. 4. Austrauschvorrichtung für die Wofatitbehandlung.

³ Vgl. O. Samuels, Z., analyt. Chem. 118, 328 [1939]; E. Wiesenberger, Mikrochem. 30, 176 [1941]; M. Goehring u. J. Darge, Z. analyt. Chem. 125, 180 [1943].

⁴ R. Grießbach, diese Ztschr. 52, 316 [1936]. Von der I. G. Farbenindustrie A.-G. Wolfen wurden uns freundlicherweise mehrere Proben von Wofatit KS zur Verfügung gestellt.

⁵ Vgl. R. Grießbach, Z. Ver. dtsch. Ing., Beih. Verfahrenstechn. 31 [1939].

dimensionen⁶⁾) und fängt dann die Lösung für die Analyse auf. Sie erwies sich als vollständig eisen-frei. Zur Bestimmung der Aufnahmekapazität des Wofatits für Eisen(III)-Ionen wurde eine $5 \cdot 10^{-2}$ m FeCl₃-Lösung in 10⁻¹ n HCl durchgedrückt und der Überlauf in Abständen mit Rhodanid auf Eisen(III) geprüft. Die ersten Eisen-Spuren traten nach etwa 250 cm³ Überlauf auf. Die Kapazität des Wofatits ist vom pH der Lösung in einem Bereich von zwei Einheiten unabhängig.

Bei der Anwendung dieser Methode auf phosphat-haltige Eisensalz-Lösung zeigte sich jedoch, daß nicht nur die Eisen(III)-Ionen, sondern auch Phosphat-Ionen in der Wofatitschicht zurückgehalten werden, u. zw. um so mehr, je größer der Überschuß der Eisen(III)-Ionen gegenüber den Phosphat-Ionen ist. Eine Lösung von reinem KH₂PO₄ dagegen passiert die Wofatitschicht unverändert. Daraus war zu schließen, daß dieser Effekt wieder auf die Neigung der Phosphat-Ionen zur Komplexbildung⁷⁾ mit Eisen(III)-Ionen zurückzuführen sein dürfte. Tatsächlich erleidet eine reine KH₂PO₄-Lösung, die durch frischen Wofatit unverändert durchläuft, einen Phosphat-Verlust, sobald sie durch einen teilweise mit Eisen(III)-Ionen beladenen Wofatit durchgedrückt wird. Es entsteht also offenbar ein Kationenkompakt zwischen Eisen(III)-Ionen und Phosphat-Ionen, u. zw. wurde neuerdings nachgewiesen⁷⁾, daß die beiden Ionen in saurer Lösung einen Komplex [FeHPO₄]⁺ bilden können, der wahrscheinlich für die Phosphat-Aufnahme durch den Wofatit verantwortlich gemacht werden muß.

Bei einem wenigstens 50fachen Eisen-Überschuß, wie er bei Stahlanalysen anfällt, werden etwa 70% des Phosphats in Form dieses Komplexes vom Wofatit gebunden. Der Komplex zerfällt erst bei höheren pH-Werten, da jedoch durch den Austausch selbst eine den Eisen(III)-Ionen äquivalente Menge an H⁺-Ionen in Lösung geht, läßt sich bei großem Eisen-Überschuß eine quantitative Entfernung der Eisen(III)-Ionen, ohne daß gleichzeitig ein Teil der Phosphat-Ionen zurückgehalten wird, nicht erreichen. Die Entfernung der Eisen(III)-Ionen nach dieser Methode ist deshalb nur dann möglich, wenn diese in maximal doppelt so großer Menge vorhanden sind wie Phosphat-Ionen. In diesem Fall enthält die Lösung (pH ~ 1) nach dem Durchlaufen der Wofatitschicht die ursprüngliche Phosphat-Menge mit einem Fehler von weniger als 0,5%. Dabei ist darauf zu achten, daß die ersten nach dem Vorlauf abfließenden Anteile der Lösung zur Analyse verwendet werden, da, wie erwähnt, bei stärkerer Anreicherung des Wofatits an Eisen(III)-Ionen auch die Phosphat-Ionen leichter zurückgehalten werden.

Wie sich zeigte, lassen sich auf diese Weise auch andere, insbes. farbige Kationen, die die photometrische Messung stören, wie z. B. Cu²⁺, Ni²⁺ usw., leicht entfernen, solange sie in vergleichbaren Mengen zum Phosphat vorhanden sind. Dies gilt auch für den Austausch von Al(III)-Ionen. Befindet sich dagegen das Aluminium in 50–100fachem Überschuß, wie es bei der Analyse von Leichtmetalllegierungen vorkommt, so treten ähnlich wie beim Eisen Phosphat-Verluste auf, die unabhängig von der Größe des Aluminium-Überschusses und der vorhandenen Phosphat-Menge etwa 3% betragen⁸⁾. Die Möglichkeit, auf diese Weise — unter Benutzung einer empirischen Korrektur —, die Al-Ionen ebenfalls zu entfernen, ist deshalb wesentlich, weil diese zwar keinen sehr großen Salzeinfluß besitzen (vgl. Abb. 1), dagegen die Extinktion des Salicylat-Komplexes und damit die Empfindlichkeit der Salicylat-Methode beträchtlich herabsetzen, was auf diese Weise vermieden werden kann. Die Salicylat-Methode ist daher zusammen mit der Wofatitbehandlung der Analysenlösung auch für die Phosphat-Bestimmung in Aluminium-Legierungen gut geeignet.

Es wurden schließlich noch einige Versuche angestellt über den Austausch zweiwertiger Eisen-Ionen an Wofatit bei Gegenwart von Phosphat-Ionen. Im Gegensatz zu den Eisen(III)-Ionen bilden Eisen(II)-Ionen mit Phosphat-Ionen keinen Kationenkompakt, so daß sich auch ein 50–100facher Überschuß an Eisen(II)-Ionen ohne Phosphat-Verlust durch Austausch entfernen läßt. Es bestände die Möglichkeit, die Phosphat-Bestimmung in Stahl in der Weise durchzuführen, daß man zunächst die Eisen(III)-Ionen zu Eisen(II)-Ionen reduziert, sodann die Lösung durch die Wofatitschicht drückt und nach dem Austausch in der beschriebenen Weise das Phosphat bestimmt. Als Reduktionsmittel haben wir H₂S in schwach saurer Lösung verwendet. Der überschüssige Schwefelwasserstoff wurde nachträglich durch CO₂ vertrieben, die Lösung filtriert und durch den Wofatit gedrückt. Etwa vorhandener kolloidaler Schwefel wird durch die Watte-schicht über dem Wofatit vollständig zurückgehalten. Jedoch auch diese Methode eignet sich deshalb nicht gut, weil bei der Reduktion der Eisen(III)-Ionen durch H₂S auch geringe Mengen Sulfit und Sulfat entstehen, die die photometrische Bestimmung, wie bereits erwähnt wurde, empfindlich zu stören vermögen.

⁶⁾ Dies wurde geprüft, indem eine Pikrinsäure-Lösung durchgedrückt wurde, deren Extinktion in gewissen Abständen mit derjenigen der ursprünglichen Lösung verglichen wurde.

⁷⁾ E. E. Lanford u. S. J. Kiehl, J. Amer. chem. Soc. 64, 291 [1942]. Phosphat-Eisensalicylat

⁸⁾ Worauf dies zurückzuführen ist, können wir nicht angeben, denn eine reine Phosphat-Lösung läuft auch durch einen teilweise mit Al³⁺ beladenen Wofatit unverändert durch, so daß eine ähnliche kationische Komplexbildung wie bei Eisen(III)-Ionen offenbar nicht eintritt.

Zusammenfassend läßt sich über die Möglichkeiten zur Phosphat-Bestimmung unter Entfernung von störenden Schwermetallkationen durch Basenaustauscher folgendes sagen: Das Verfahren ist in allen Fällen brauchbar, in denen Metallkationen, die die photometrische Messung des Eisen-Salicylsäure-Komplexes in Gegenwart von Phosphat-Ionen zu stören vermögen, lediglich in vergleichbaren Mengen zum Phosphat vorhanden sind. In diesen Fällen lassen sich die Metallkationen quantitativ ohne Phosphat-Verlust durch Austausch in saurer Lösung (pH ~ 1) an Wofatit entfernen. Damit ist die Phosphat-Bestimmung z. B. in Böden nach dieser Methode möglich und leicht ausführbar. Sind jedoch die Metallkationen in größerem Überschuß vorhanden, so können Fehler auftreten, die z. B. auf einer teilweisen Bindung des Phosphats in Kationenkomplexen beruhen und damit die Bestimmung unmöglich machen. In anderen Fällen, wie z. B. beim Al³⁺, können derartige Fehler durch empirische Korrekturen berücksichtigt werden, so daß die Methode auch anwendbar bleibt.

d) Entfernung von Schwermetallkationen durch elektrolytische Abscheidung.

Um die Methode auch für die Stahlanalyse brauchbar zu machen, könnte man daran denken, die Eisen(III)-Ionen kathodisch zu Eisen(II) zu reduzieren und durch Wofatit nachträglich abzutrennen. Wir haben jedoch versucht, das Eisen nebst anderen Schwermetallen vollständig kathodisch abzuscheiden und auf diese Weise die Wofatitbehandlung der Lösungen ganz zu vermeiden. Die elektrolytische Abtrennung des Eisens wurde bereits für die quantitative Bestimmung des Aluminiums in Stählen benutzt⁹⁾. Wir konnten sie auch mit Erfolg für die Phosphat-Bestimmung heranziehen. Die Streuung der Methode beträgt weniger als $\pm 1\%$ des vorhandenen Phosphats.

Die Elektrolysiereinrichtung ist in Abb. 5 dargestellt. Als Kathode dient Quecksilber, als Anode eine Platin-Drahtspirale, die gleichzeitig als Rührer verwendet wird. Die

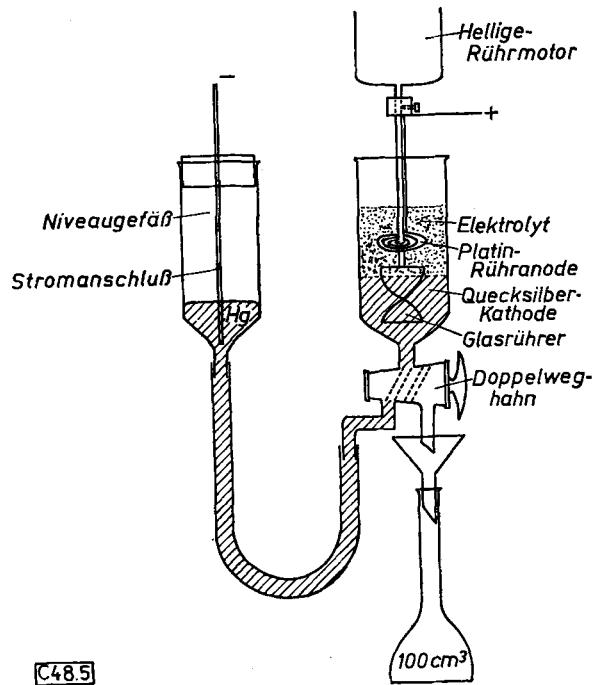


Abb. 5. Elektrolysiereinrichtung (schematisch) zur Abtrennung von Eisen- und Schwermetallen.

Möglichkeit, das Eisen aus schwach saurer Lösung kathodisch abscheiden zu können, beruht auf der Überspannung des Wasserstoffes an Quecksilber; es ist deshalb zweckmäßig, daß pH der Lösung möglichst hoch zu wählen, damit auch gegen Schlüß der Elektrolyse bei geringem Gehalt an Eisen(III)-Ionen die Wasserstoff-Abscheidung nach Möglichkeit klein gehalten wird. Chloridhaltige Lösungen eignen sich wegen der Bildung des Anionenkomplexes [FeCl₆]⁴⁻ nicht. Auch bei salpetersauren Lösungen ergaben sich Schwierigkeiten, weil das NO₃⁻-Ion an der Kathode teilweise bis zum Ammoniak reduziert wird, so daß wechselnde Mengen von NH₄NO₃ entstehen, die bei der photometrischen Messung Salzfehler hervorrufen. Das ebenfalls zum Teil gebildete NO₂ wirkt außerdem störend auf die Farbintensität des Eisen-

⁹⁾ W. Koch, Forschungsber. Krupp 1938, S. 37 ff.

Salicylat-Komplexes. Die Stahlproben wurden deshalb in Königswasser gelöst, die Lösung weitgehend eingedampft und zweimal mit 70%iger HClO_4 bis annähernd zur Trockene abgeraucht. Die Lösung enthält dann praktisch weder Cl^- noch NO_3^- -Ionen mehr. Es wird mit Wasser aufgenommen und bei $\text{pH} \sim 1$ bis zur vollständigen Eisen-Freiheit (Rhodanid-Probe) elektrolysiert. Dabei erwies es sich als zweckmäßig, nicht nur den Elektrolyten, sondern auch das als Kathode dienende Quecksilber mit einem kombinierten Platin-Glas-Rührer kräftig zu rühren, da auf diese Weise das abgeschiedene Eisen rascher vom Quecksilber aufgenommen wird. Dies hat außerdem den Vorteil, daß das Quecksilber wesentlich mehr Eisen aufzunehmen vermag, bevor es durch Destillation gereinigt werden muß. Nach Beendigung der Elektrolyse wird die Lösung in einen Meßkolben filtriert und das Phosphat in der beschriebenen Weise bestimmt.

IV. Messvorschrift.

Die **Eichkurve** d. h. die Abhängigkeit der Extinktion der Eisensalicylat-Lösung von der Phosphat-Konzentration, wird photometrisch im grünen Spektralbereich aufgenommen. Das Maximum der Absorption liegt bei $550 \text{ m}\mu$, wie aus dem photographisch gemessenen Absorptionsspektrum der Abb. 2 hervorgeht.

Als **Vergleichslösung** kann an Stelle von Wasser auch eine Eisensalicylat-Lösung ohne Phosphat-Zusatz verwendet werden. Man mißt auf diese Weise direkt den Extinktionsunterschied, der durch den Phosphat-Gehalt bedingt ist, und erhält eine entsprechende Eichkurve.

Die **Eichlösungen** werden auf folgende Weise hergestellt: In einen 250 cm^3 -Meßkolben werden $2-50 \text{ cm}^3$ einer $2 \cdot 10^{-3} \text{ m}$ KH_2PO_4 -Lösung gegeben, mit Wasser auf etwa 50 cm^3 verdünnt und mit 3 Tropfen einer $0,025 \text{ n}$ $\text{Na}-\beta$ -Dinitro-phenolat-Lösung versetzt. Dann wird verdünnte Salzsäure zugegeben, bis die Lösung nur noch schwach hellgelb ist (Vergleich mit einem Standard). Dann werden 25 cm^3 einer $2 \cdot 10^{-3} \text{ m}$ Natriumsalicylat-Lösung und 25 cm^3 einer $2 \cdot 10^{-3} \text{ m}$ Eisen(III)-chlorid-Lösung in $0,1 \text{ n}$ Salzsäure zugegeben, auf 250 cm^3 aufgefüllt und sofort gemessen. Die Extinktion dieser Lösungen bleibt tagelang konstant. Ebenso werden Lösungen unbekannten Phosphat-Gehaltes behandelt. Die pH -Einstellung der Meßlösung erfolgt mit verd. HCl - resp. NaOH -Lösung.

ZUSCHRIFTEN

Einfluß organischer Quecksilber-Verbindungen auf die Zellkernteilung im pflanzlichen und tierischen Organismus. Mitose und Mitosegifte.

Von Prof. Dr. A. Klages, Göttingen.

Nach Thomas u. Drews¹⁾ hat Quecksilberäthylchlorid an pflanzlichem Material polyploidisierende Wirkung. Ich selbst konnte schon vor einer Reihe von Jahren bei der Prüfung quecksilberorganischer Verbindungen auf ihre Eignung als Saatgutbeizen feststellen, daß Quecksilberalkylhalogenide, insbes. Quecksilbermethyl- und Quecksilberäthylchlorid, auf den Keimungsprozeß eine sehr eigenartige Wirkung ausüben²⁾, welche darin besteht, daß das Längenwachstum der Zellen zwar gehemmt, die Bildung neuer Zellen aber nicht unterbunden wird. Keimwurzeln und Koleoptile sind bei den behandelten Körpern sehr kurz und bedeutend dicker als bei den unbehandelten. Auch bei G. Gaßner³⁾ ist zu lesen, daß A. Klages bereits 1927 als erster Polyploidie durch Anwendung chemischer Stoffe erzielt hat. Aber schon 1925 habe ich ausgeführt, daß die organischen Quecksilber-Verbindungen, mit denen das Saatgut gebeizt wird, bis zur Beendigung des Vegetationsprozesses in der Pflanze zirkulieren und sie unter Bildung von Reizstoffen zu erhöhter Zelltätigkeit anregen⁴⁾. Hg findet sich im geernteten Saatgut. Diese merkwürdigen, auf Störung des Zellteilungsprozesses beruhenden Entwicklungsanomalien sind 1941 von D. Kostoff⁵⁾ als Polyploidie erkannt worden. Derartige Polyploidien, d. h. Vervielfachungen der Chromosomensätze, entstehen bisweilen in der Natur spontan

Standardlösungen.

Die $2 \cdot 10^{-3} \text{ m}$ Eisen(III)-chlorid-Lösung in $0,1 \text{ n}$ HCl wird am besten durch Verdünnen einer 10mal konzentrierteren Lösung hergestellt. Diese konzentrierte Lösung erhält man durch Auflösen von $5,406 \text{ g}$ $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$, Merck pro anal. im Liter $n \cdot \text{HCl}$. Nach Neuherstellung der konzentrierten Lösung kann ihr Eisen-Gehalt durch eine Messung ohne Phosphat-Zusatz kontrolliert werden. Die Eisenchlorid-Lösung soll zur Vermeidung von Hydrolyse in Salzsäure aufbewahrt werden. Einmal eingetretene Hydrolyse wird durch späteren Säurezusatz nur langsam rückgängig gemacht und gibt daher Anlaß zu fehlerhaften Meßergebnissen. In $0,1 \text{ n}$ HCl halten sich $2 \cdot 10^{-2} \text{ m}$ Eisenchlorid-Lösungen monatelang unverändert.

$$2 \cdot 10^{-3} \text{ m} \text{ Natriumsalicylat-Lösung} = 0,3200 \text{ g/l.}$$

$$2 \cdot 10^{-3} \text{ m} \text{ } \text{KH}_2\text{PO}_4 = 0,2723 \text{ g prim. Kaliumphosphat nach Sörensen je Liter.}$$

$0,025 \text{ n}$ Natrium- β -Dinitro-phenolat wird durch Auflösen von $0,46 \text{ g}$ β -Dinitro-phenol in 100 cm^3 $0,025 \text{ n}$ NaOH hergestellt.

Bei der **Phosphat-Bestimmung in Stählen** werden etwa $0,4 \text{ g}$ der Stahlprobe in 10 cm^3 Königswasser (1:1) gelöst. Die Lösung wird in einer Porzellanschale eingelegt und mit je 10 cm^3 70%iger HClO_4 zweimal unter Röhren bis angenähert zur Trockne eingedampft. Dann wird mit dest. Wasser aufgenommen, in einen 100 cm^3 -Meßkolben filtriert und sorgfältig nachgewaschen. 25 cm^3 der zur Marke aufgefüllten Lösung ($\text{pH} \sim 1$) werden 30 min mit einer Stromstärke von etwa 3 A elektrolysiert, wobei sowohl der Elektrolyt als auch das als Kathode dienende Quecksilber kräftig gerührt werden muß. Nach Abstellen des Rührers wird der Quecksilber-Spiegel mit Hilfe des Niveaugefäßes gesenkt, ohne daß man die angelegte Spannung abschaltet, und die Lösung durch ein Hartfilter in einen 100 cm^3 -Meßkolben filtriert. Röhren und Elektrolysergefäß werden sorgfältig mit dest. Wasser gespült, ebenso wird der Hahn des Gefäßes durch Heben und Senken des Niveaugefäßes mit Wasser durchgespült. Die Lösung wird mit 2 n NaOH unter Zusatz weniger Tropfen β -Dinitro-phenol-Lösung bis zur schwachen Gelbfärbung titriert und auf 100 cm^3 aufgefüllt. Die Phosphat-Bestimmung erfolgt dann in der beschriebenen Weise gegen eine Vergleichslösung, die kein Phosphat, dagegen die gleiche Menge NaOH und HClO_4 enthält, damit Salzfehler vermieden werden.

Eingeg. am 24. Oktober 1944. [A.48.]

durch Mutation. Durch Weiterzucht der Mutanten sind auf diese Weise unsere polyploiden, ertragreichen Getreidearten, in neuerer Zeit die Süßlupinen entstanden.

1937 stellte Blakeslee⁶⁾ einen solchen polyploidisierenden Einfluß des Colchicins auf die pflanzliche Kernteilung fest. Die Anwendung dieses Alkaloids hat es möglich gemacht, von jeder Pflanze in recht einfacher Weise neuartige Pflanzenformen mit gesteigerter Chromosomenzahl herzustellen und Leistungen zu erzielen, die für die Pflanzenzucht von Bedeutung geworden sind⁷⁾. Auf Bakterien und Hefen ist Colchicin ohne Wirkung⁸⁾.

Im Gegensatz zum pflanzlichen Organismus hat das Colchicin, wie Dustin⁹⁾ und Lits¹⁰⁾ gefunden haben, die Fähigkeit, im Teilungsstadium befindliche tierische Zellen an der Beendigung der Kernteilung zu hemmen. Colchicin wirkt in dieser Hinsicht als Mitosegift¹¹⁾. Diese gleichgerichtete Polyploidie-Wirkung des Colchicins und der Quecksilberalkyl-Verbindungen auf die pflanzliche Zelle gab den Anlaß, das Verhalten von Organoquecksilber-Verbindungen an tierischem Material, zunächst in der Gewebekultur zu prüfen. Auf meine Bitte hat Prof. Lettré in Göttingen schon Anfang 1943 quecksilberorganische Verbindungen in der Gewebekultur an Hühnerherzfibroblasten geprüft und beim Quecksilberäthylchlorid und ähnlich gebauten Stoffen eine starke Mitosegwirkung (Größenordnung $2-5 \text{ } \mu/\text{cm}^3$ Hg-molar) festgestellt, die sich vom chemischen Bau der betreffenden Stoffe stark abhängig erwies. Über das inzwischen stark erweiterte Versuchsmaterial wird zu gegebener Zeit berichtet werden.

¹⁾ J. Hered. 28, 393 [1937]; Naturwiss. 28, 353 [1940].

²⁾ Von Sengbusch: Pflanzenzüchtung. Soc. Verl. Frankfurt 1939.

³⁾ Proc. Soc. exp. Biol. Med. 44, 271 [1939]; J. Bacteriol. 39, 20 [1940].

⁴⁾ Bull. Acad. roy. Méd. Belgique 14, 487 [1934]; Arch. exp. Zellforsch. 22, 395 [1939].

⁵⁾ C. R. Séances Soc. Biol. Filiales Associées 115, 1421 [1934].

⁶⁾ Arch. exp. Zellforsch. 18, 411 [1936].

⁷⁾ Diese Ztschr. 40, 559 [1927].

⁸⁾ Phytopathol. Z. 14, 385 [1943].

⁹⁾ Diese Ztschr. 39, 3 [1926]; Heubner, Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Pathol. Pharmakol. 111, 41 [1926].

¹⁰⁾ Phytopathol. Z. 18, 91 [1941]; Chem. Ztbl. 1940 II, 1495.