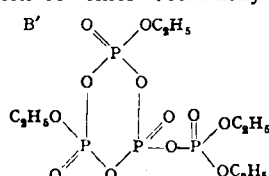
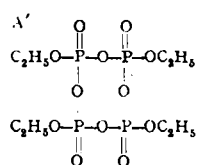


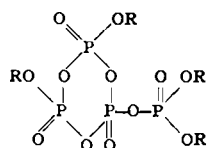
die beiden Verbindungen A und B in einem Mengenverhältnis von A:B = 1:3 erwarten.

Das  $P_4O_{10}$  reagiert aber nicht nur mit Wasser, sondern wie K. Langheld<sup>21)</sup> (1910) fand, auch mit Äther. Dabei entsteht, wie sich vor kurzem zeigte<sup>22)</sup> (1951), ein Gemisch zweier Ester, denen eindeutig die Konstitutionen A' eines Tetra-äthylesters



der Tetra-metaphosphorsäure und B' eines Tetra-äthylesters der Iso-tetrametaphosphorsäure zukommen. Im Fall der Ester ist das Ausbeuteverhältnis von A':B' = 1:8 bis 1:9.

Der Beweis der Konstitution B' ergab sich u. a. durch den Befund, daß bei der Hydrolyse dieses Esters mit Wasser neben zwei Mol Monoäthyl-phosphorsäure stets äquivalente Mengen von Monophosphorsäure und Diäthyl-monophosphorsäure auftreten.



Hiermit dürfte der erste Schritt zum Beweis der Existenz von Iso-metaphosphorsäuren getan sein. Weiteren Untersuchungen muß es vorbehalten bleiben, die Eigenschaften dieser und analoger Verbindungen zu ermitteln.

#### IV. Kompliziert gebaute kondensierte Phosphate

In diese Gruppe gehören zwei Verbindungen, die zu den am längsten bekannten Metaphosphaten gehören. Es sind dies das *Grahamsche* und *Kurrolsche* Natriumsalz.

Das *Grahamsche* Salz, das durch Abschrecken der aus primärem Natriumphosphat bei etwa 600° oder höher erhaltenen Schmelze als klar durchsichtiges hygroskopisches Glas entsteht, wurde und wird auch heute noch als Hexametaphosphat bezeichnet. Durch Diffusionsmessungen von K. Karbe und G. Jander<sup>23)</sup> (1942) ergab sich aber zweifelsfrei, daß es eine sehr hoch polymere Substanz ist. Auch alle seine anderen Eigenschaften, z. B. die, sich zu zähen, fadenziehenden amorphen Massen auszurollen zu lassen, sprechen dafür. Seine Konstitution ist bisher unbekannt. Sicher aber ist, wie R. N. Bell<sup>24)</sup> (1947) fand, daß aus ihm beim Kochen mit Wasser Trimetaphosphat entsteht. Noch nicht abgeschlossene Versuche zeigen uns, daß sein Anion mindestens zu

<sup>21)</sup> Ber. dtsch. chem. Ges. 43, 1857 [1910]; 44, 2076 [1911]; 45, 1125, 3737, 3760 [1912].

<sup>22)</sup> R. Rätz u. E. Thilo, Lieb. Ann. Chem. 572, 173 [1951].

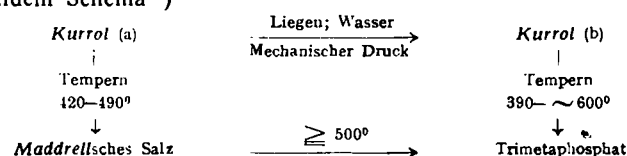
<sup>23)</sup> Kolloid-Beih. 54, [1942]. <sup>24)</sup> Ind. Engng. Chem. 39, 136 [1947].

75%, wahrscheinlich aber zu mehr, aus Trimetaphosphat-Anionen als Elementarbaustein aufgebaut ist. Dabei setzen wir voraus, daß sich die Trimetaphosphat-Anionen nicht erst sekundär aus noch unbekannten Primärprodukten der Spaltung bilden. Über die Art ihrer Verknüpfung läßt sich bisher keine exakt begründbare Aussage machen.

Die wasserenthärtende Wirkung des unter dem Namen *Calgon* gehandelten *Grahamschen* Salzes stellen wir uns als Ionenaustauschreaktion an in seinen Lösungen vorhandenen Riesensalzmolekeln vor.

Das *Kurrolsche* Natriumsalz, das nach Huber<sup>25)</sup> (1943) aus dem *Grahamschen* Salz beim Tempern innerhalb eines ganz bestimmten Temperaturintervalls entsteht, hat wie das *Grahamsche* Salz stöchiometrisch die Zusammensetzung  $(\text{NaPO}_3)_x$ . Seiner äußeren Erscheinung nach hat es große Ähnlichkeit mit Asbest. Es ist aber merklich in Wasser löslich; eine ~ 1proz. Lösung ist zäh wie Glycerin. Wir halten das *Kurrolsche* Natriumsalz für die kristalline Form des *Grahamschen* Salzes, weil es wie dieses beim Kochen mit Wasser als wesentliches Aufspaltungsprodukt Trimetaphosphat ergibt.

Es kommt in zwei Formen a und b vor, von denen das beim Tempern aus *Grahamschem* Salz entstandene *Kurrol(a)* nach folgendem Schema<sup>26)</sup>



beim Liegen, beim Behandeln mit Wasser und schon bei rein mechanischer Beanspruchung in die Form b übergeht. Beide Formen unterscheiden sich durch ihr Röntgendiagramm und außerdem dadurch, daß die a-Form beim Tempern zwischen 420–490° C quantitativ in *Maddrellsches* Salz, die b-Form zwischen 390–600° quantitativ in Trimetaphosphat übergeht; Beobachtungen, die noch manche Arbeit zu ihrer Deutung benötigen werden.

Von vielen kondensierten Phosphaten sind bisher eingehend nur die Natriumsalze untersucht. Genau wie bei den Polysilicaten zeigt sich auch hier, daß die Art des sich bildenden Anions nicht nur von der Art der Herstellung, sondern auch von der Art der anwesenden Kationen abhängt. Aber auch in Bezug auf diese Probleme sind unsere Kenntnisse noch immer sehr gering, so daß bis zu einer völligen Klärung und Beherrschung der Chemie der kondensierten Phosphate noch eine erhebliche Arbeit zu leisten sein wird.

Eingeg. am 5. September 1951 [A 386]

<sup>25)</sup> H. Huber u. K. Klumpner, Z. anorg. allg. Chem. 251, 213 [1943].

<sup>26)</sup> E. Thilo u. G. Schutz, unveröffentlicht.

## Weitere Versuche zur Stofftrennung durch Papierchromatographie und -Ionophorese. Purine und Aminosäuren

Von Prof. Dr. THEODOR WIELAND und LISELOTTE BAUER

Aus dem organisch-chemischen Institut der Universität Mainz

Nach Besprühen mit sehr verdünnter alkalischer Fluorescein-Lösung treten im UV-Licht von 254 mμ die dort absorbierenden Substanzen im Papierchromatogramm auf grüngelb fluoreszierendem Hintergrund als dunkle Flecken deutlich hervor. Mit diesem Test wurde das Verhalten einiger Xanthin-Derivate im Papierchromatogramm und der Spaltnucleotide von Hefenucleinsäure bei der Papier-ionophorese untersucht. Ferner wird ein Lösungsmittel zur papierchromatographischen Trennung von Leucin und Isoleucin angegeben und mit der Zimt-aldehyd-HCl-Reaktion Tryptophan in Aminosäure-Gemischen sicher nachgewiesen.

#### Purin- und Pyrimidin-Derivate

Außer mit dem Studium der Trennung und retentionsanalytischen Bestimmung von Aminosäuren<sup>1)</sup> und Oxyssäuren<sup>2)</sup> haben wir uns vor einiger Zeit auch mit der Papierchromatographie von Purin-Substanzen befaßt. Da wir eine andere Nachweismethode benützen als Markham und Smith<sup>3)</sup>, die vor uns mit der Bearbeitung dieses Gebiets begonnen haben, seien unsere Versuche kurz geschildert. Zur Lokalisierung von Purinen und Pyrimidinen im Papierchromatogramm sind mehrere Verfahren beschrieben

<sup>1)</sup> Th. Wieland u. L. Wirth, diese Ztschr. 63, 171 [1951].

<sup>2)</sup> Th. Wieland u. U. Feld, ebenda 63, 258 [1951].

<sup>3)</sup> Biochemic. J. 45, 294 [1949].

worden. So hat man die Chromatogramme von Nucleotiden zunächst mit Salzen des  $\text{Hg}^{2+}$  behandelt und, nach dem Herauswaschen des Überschusses, gebundenes Hg mit Schwefelwasserstoff als dunkle Sulfid-Flecken nachweisen können<sup>4)</sup>. Empfindlicher und allgem. brauchbar ist die direkte Photokopie im UV (Photoprint<sup>5)</sup>), die vielerorts verwendet wird. Dabei wird von der Eigenschaft der Purine und Pyrimidine Gebrauch gemacht, Licht von 250–260 mμ zu absorbieren, so daß im Kontaktabzug bei Verwendung solchen Lichtes auf gewöhnlichem Photopapier unter den Substanzstellen helle weniger belichtete Stellen

<sup>4)</sup> H. Huber u. E. Chargaff, J. biol. Chemistry 176, 703 [1948].

aufzutreten. Gewisse im UV fluoreszierende Filterpapiersorten lassen dabei größere Substanzmengen als dunklere Flecken schon mit dem Auge erkennen<sup>6)</sup>, im Licht einer sog. *Mineralight lamp* treten sie fluoreszierend hervor<sup>6)</sup>. Man kann diese Fluoreszenzlösung zu einer recht empfindlichen Methode zur raschen Feststellung von UV-absorbierenden Substanzen auf dem Filtrierpapier machen, indem man die Chromatogramme mit sehr verdünnter (ca. 0.005proz.) Lösung von Fluorescein in 0,5n Ammoniak besprüht und, ohne sie ganz zu trocknen, im gefilterten UV-Licht betrachtet. Als Lichtquelle dient eine Hanauer Analysenquarzlampe, deren Licht durch ein UG 5-Glas (Schott u. Gen.) und eine mit Chlor von Atmosphärendruck gefüllte, 30 mm dicke Quarzküvette tritt, in die noch ein Tropfen Brom eingebracht ist. In diesem Licht, das zur Hauptsache die Quecksilberlinien 254 und 265 m $\mu$  enthält, fluoresziert das besprühte Blatt deutlich gelbgrün, während die absorbierenden Substanzen als dunkle Flecken erscheinen. Die untere Sichtbarkeitsgrenze liegt bei 5–10  $\gamma$  im pfenniggroßen Flecken.

Nach Abschluß unserer Versuche erschien eine Arbeit von Gordon und Reichard<sup>7)</sup>, in der zur Sichtbarmachung von Oligonucleotiden im Agar-Ionophorogramm ebenfalls Fluorescein benutzt wird. Nachdem sich unser Sprühverfahren zur Sichtbarmachung von Knollenblätterpilzgiften auf Filtrierpapier, sowie zur Lokalisierung von absorbierenden Proteinen (wobei höhere Substanzkonzentrationen erforderlich sind) bewährt hatte, haben wir es auch bei Papierchromatogrammen von Purinen herangezogen.

Die Xanthin-Derivate 7-Methylxanthin (I), 3-Methylxanthin (II), 3,7-Dimethylxanthin (Theobromin (III)), 1,7-Dimethylxanthin (Paraxanthin (IV)), 1,3-Dimethylxanthin (Theophyllin (V)) und 1,3,7-Trimethylxanthin (Coffein (VI)) lassen sich durch 2-dimensionale aufsteigende Papierchromatographie in gebräuchlichen Lösungsmitteln gut trennen. In Bild 1 ist ein solches Chromatogramm (je 0,1proz. Lösung der Komponenten) wiedergegeben, das zuerst mit Wasser-gesättigtem n-Butanol und dann mit n-Propanol-wäßr. Ammoniak (6 Vol n-Prop.: 4 Vol 20proz. Amm.) gelaufen war. Die geschilderte Nachweismethode zeigte die im Diagramm wiedergegebene Lage der absorbierenden Flecken, deren  $R_F$ -Werte in den beiden Lösungsmitteln an der Ordinate und Abszisse abzulesen sind. Leider war keine definierte Abhängigkeit der Fleckengröße von der Substanzkonzentration festzustellen, weshalb man Mengenangaben nur in grober Schätzung geben kann und besser die Absorption der Eluate aus den Flecken im Maximum quantitativ bestimmt. Dabei stört die winzige Fluorescein-Menge nicht.

Bei diesen Studien leitete uns die Neugier, ob in den bekannten Purin-haltigen Pflanzen neben den als Inhaltsstoffen bekannten vielleicht noch andere Purine in kleiner Menge vorhanden seien. Wir wurden aber bei dieser Suche enttäuscht, denn es fand sich im Extrakt von Kaffeebohnen nur Coffein, in Tee- und Mate-

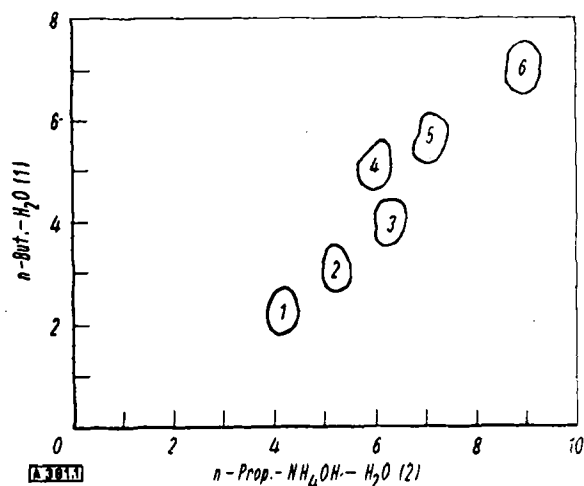


Bild 1

Zweidimensionales Papierchromatogramm eines Gemisches von 6 methylierten Xanthinen (Bezeichnung s. Text)

<sup>6)</sup> E. Chargaff, B. Magasanik, R. Doniger u. E. Vischer, J. Amer. Chem. Soc. 71, 1513 [1949].

<sup>6)</sup> C. E. Carter, J. Amer. Chem. Soc. 72, 1466 [1950].

<sup>7)</sup> Biochemic. J. 48, 569 [1951].

blättern neben Coffein etwas Theophyllin und im Kakaomehl nur Theobromin.

Mit der Fluorescein-Methode läßt sich auch das Verhalten von Nucleotiden bei der Papierionophorese<sup>8)</sup> gut verfolgen, das wir an den Komponenten der Hefenucleinsäure untersucht haben. Diese lassen sich ähnlich wie die Spaltprodukte der Adenosin-triphosphorsäure<sup>9)</sup> in saurem Acetatpuffer im elektrischen Feld auf dem Filtrierpapier trennen. Im Gegensatz zu dem Befund bei der Ionophorese im Agar-gel<sup>7)</sup> werden auf dem Papier auch Uridyl- und Guanylsäure auseinandergezogen, wie aus Bild 2 hervorgeht<sup>10)</sup>. Zur quantitativen Bestimmung der Nucleotide kann man hier nach streifenförmiger Auftragung des Gemischs die Retentionsanalyse mit Cu heranziehen, worüber Experimente im Gange sind.



Bild 2

Pherogramm eines Gemisches (je 0,5proz.) von Hefadenylsäure (A), Cytidylsäure (C), Guanylsäure (G) und Uridylsäure (U) in m/20 Acetat-Essigsäure (pH 2,8, 120 V, 5 h)  $\frac{1}{2}$  nat. Größe

### Aminosäuren

Die Papierchromatographie der Aminosäuren, die heute über einige Dutzend geeigneter Lösungsmittel verfügt, entbehrt immer noch eines schnell arbeitenden Mittels zur Trennung von Leucin und Isoleucin. Nach längeren Bemühungen sind wir

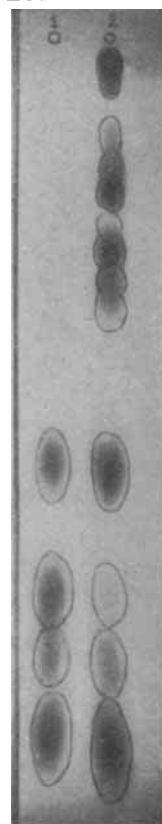
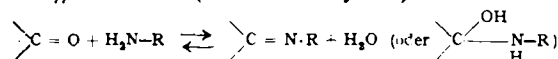


Bild 3

Papierchromatogramm (absteigend) von 1) Valin, Methionin, Isoleucin, Leucin und 2) Caseinhydrolysat und Oxypurin. Lösungsmittel: 70 Vol. Methyl-äthyl-Keton, 15 Vol. Pyridin, 15 Vol. Wasser. Laufzeit: 24 h.

Aldehyden und Ketonen, auch in Anwesenheit von Wasser, wobei sich ein Gleichgewicht zwischen diesen Reaktionspartnern und einer Schiff'schen Base (oder deren Hydrat) einstellt:



Die Existenz einer solchen Reaktion gibt sich z. B. in Neubergers<sup>11)</sup> Befund zu erkennen. Danach läßt die Papierchromatographie von Tryptophan in Gegenwart von Formaldehyd eine

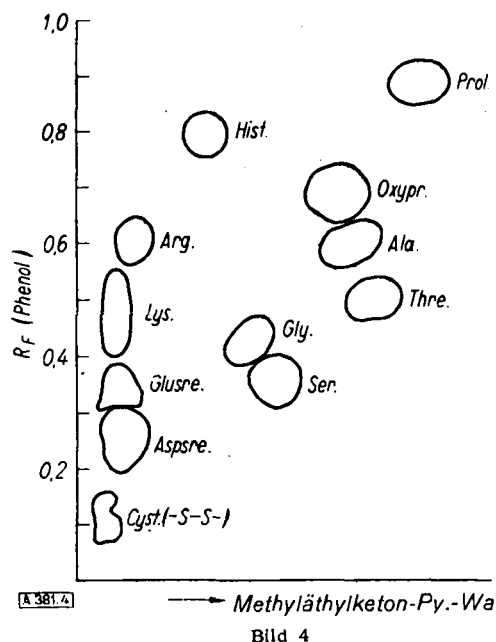
<sup>8)</sup> Th. Wieland u. E. Fischer, Naturwiss. 35, 29 [1948]; diese Ztschr. 61, 452 [1949].

<sup>9)</sup> F. Turba u. H. J. Enenkel, Naturwiss. 38, 189 [1951].

<sup>10)</sup> Als Verbesserung unserer Elektrophoreseanordnung<sup>2)</sup> hat sich der Ersatz der Kohlelektroden durch Platindrähte herausgestellt. Diese werden ohne Zwischengefäße oder Diaphragmen in genügend große (5000 cm<sup>2</sup>) Elektrodenchalen getaucht, in die auch die Papierstreifen eintauchen. Bei dieser Anordnung ist Spannungs- und p<sub>H</sub>-Konstanz über viele Stunden gewährleistet.

<sup>11)</sup> A. Neuburger, Biochemic. J. 48, 111 [1951].

schnellwandernde Komponente erkennen, die mit Ninhydrin gelbe Farbreaktion gibt und der die Struktur einer Tetrahydro-carbolin-3-carbonsäure zugeschrieben wird. Hier hat sich das primäre Reaktionsprodukt mit dem Aldehyd durch Ringschluß stabilisiert. In gleicher Weise scheinen auch aus Ketonen und den aromatischen Aminosäuren heterocyclische Säuren zu entstehen, die mit Ninhydrin viel schwächere und anders getönte Farbreaktionen als die Ausgangsaminosäuren geben. Sie tauchen deshalb bei der im normalen Proteinhydrolysat vorliegenden Konzentration im Papierchromatogramm gar nicht auf. Die anderen Aminosäuren wandern vielleicht in Form der Schiff-schen Basen und verlieren die Carbonyl-Komponente beim Trocknen der Chromatogramme.



Die im Chromatogramm (Bild 3) vor dem Valin befindlichen Eiweißbausteine lassen sich in der zweiten Dimension aufsteigend mit Phenol-Wasser vollständig trennen, wie aus Bild 4 ersichtlich ist.

Zu einer Gesamtanalyse mußten deshalb noch die drei verschwundenen aromatischen Aminosäuren in einfacher Weise nachzuweisen sein. Wir haben deshalb die Brauchbarkeit der Reaktion mit Zimtaldehyd-HCl zum Nachweis des Tryptophans in Papierchromatogrammen genauer untersucht. Wie be-

reits bei unseren Arbeiten über die Giftstoffe des Knollenblätterpilzes berichtet<sup>12)</sup> und von H. Dilger in seiner Dipl.-Arbeit über die Farbreaktionen auf Indol-Verbindungen eingehend untersucht wurde, besteht eine sehr empfindliche Nachweisreaktion dieser Substanzklasse darin, daß man das Papierchromatogramm mit einer 1proz. Lösung von frisch destilliertem Zimtaldehyd in Methanol besprüht und nach dem Verdunsten des Methanols in eine möglichst konzentrierte Atmosphäre von HCl-Gas bringt. Dabei entsteht aus Tryptophan ein dunkel rotbrauner Farbstoff, der noch beim Vorliegen von 5  $\gamma$  Tryptophan gut zu erkennen ist. Zu seinem Nachweis in Aminosäure-Gemischen muß eine Papierchromatographie vorausgehen. Dazu ist als Lösungsmittel ganz verdünnte (ca. m/50) wäßrige Salzsäure gut geeignet<sup>13)</sup>. Darin wandern alle Aminosäuren mit großem  $R_F$  (ca. 0,9), Phenylalanin und Tyrosin mit  $R_F$  ca. 0,8, während Tryptophan als einzige mit  $R_F$  0,7 zurückbleibt. Es läßt sich dann nach einer solchen Chromatographie mit der Zimtaldehyd-Reaktion in tryptischen oder alkalischen Hydrolysaten der gewöhnlichen Proteine (von 0,5% ab), auch nach erfolgter Sichtbarmachung der Aminosäuren mit Ninhydrin, gut nachweisen. Als weitere natürliche Aminosäuren, die mit Zimtaldehyd nach Färbung mit Ninhydrin eine violett-braune Reaktion geringerer Empfindlichkeit geben, wurden das Prolin und Oxyprolin gefunden, deren spez. Nachweis auf diese Weise ebenfalls gelingt. Oxytryptophan gibt in höherer Konzentration als Tryptophan eine gelbe Farbreaktion.

Nimmt man weiterhin die Farbreaktion mit diazotierter Sulfanilsäure zu Hilfe, so gelingt im geschilderten Chromatogramm auch der Nachweis des Tyrosins, das ja vom störenden Tryptophan getrennt ist. Auch mit der Fluorescein-Sprühmethode ist Tyrosin erkennbar, besonders wenn man das Sprühreagens in n/10 Natronlauge anwendet, weil dann die stärkere UV-Absorption des Tyrosin-phenolat-Ions zur Wirkung kommt. Phenylalanin entgeht wegen seiner relativ schwachen Absorption diesem Nachweis. Um die aromatischen Aminosäuren sicher zu finden, chromatographiert man am besten zweidimensional. Hier eignet sich als erstes Lösungsmittel 95proz. Methanol, worin die genannten Aminosäuren mit  $R_F$  0,33 (Try), 0,44 (Tyr) und 0,54 (Ph Al) voneinander getrennt werden. In zweiter Dimension führt eine Mischung aus 75 Vol. sec. Butanol und 15 Vol. 85%iger Ameisensäure und 10 Vol. Wasser zur Abtrennung von den Begleitern. Hierbei bleiben von den schnell wandernden Aminosäuren nur Leucin-Isoleucin zusammen<sup>14)</sup>.

Eingeg. am 21. August 1951

[A 381]

- <sup>12)</sup> Th. Wieland, L. Wirth u. E. Fischer, Liebigs Ann. Chem. 564, 152 [1949].  
<sup>13)</sup> Private Mitt. von Dr. S. Moore, New York.  
<sup>14)</sup> Versuche von Frl. Sitzius.

## Analytisch-technische Untersuchungen

# Betriebsanalytische Bestimmung geringer Eisen-Gehalte in Zink und Aluminium

Von Dr. E. EBERIUS, A.-G. für Zink-Industrie vorm. Wilhelm Grillo, Duisburg-Hamborn

Es wird die photometrische Bestimmung von Eisen in Zink und Aluminium mit Sulfosalicylsäure beschrieben. Das Verfahren wurde für Serienuntersuchungen ausgearbeitet.

Bestandteile unter 0,01% beeinflussen bekanntlich in vielen Fällen die Eigenschaften von Metallen und Verbindungen entscheidend. Daher ist ihre schnelle, quantitative Erfassung vor und während der Verarbeitung wichtig. Bei dem viel verwendeten Feinzink mit 99,995% Zink-Gehalt darf die Summe der meist aus Kupfer, Zinn, Blei, Cadmium und Eisen bestehenden Verunreinigungen nicht mehr als 0,005% betragen. Der Eisen-Gehalt liegt bei ca. 0,001% und darunter, ist also gewichts- und maßanalytisch erst durch Einwaagen von 200 g und darüber zu erfassen, was Stunden erfordert. Ähnliches gilt für die Bestimmung des Eisens in Reinaluminium und Aluminium-Legierungen. Spektrophotographie und Polarographie helfen nicht wei-

ter, weil die Eisen-Konzentration unter der für die störungsfreie Erfassung notwendigen Grenze liegt.

Es wurde nach einer Methode gesucht, die die Bestimmung von einigen Hundertstel bis Zehntausendstel % Eisen in Minuten ermöglicht.

Bei der Durchmusterung der zur Verfügung stehenden Verfahren verblieben als genügend robust und handlich die kolorimetrischen bzw. photometrischen Methoden (Unterscheidung kolorimetrischer von photometrischen Methoden<sup>1)</sup>), die auch die für den vorliegenden Fall notwendige Genauigkeit zu besitzen schienen.

<sup>1)</sup> G. Kortüm: Kolorimetrie und Spektralphotometrie, Springer-Verlag 1948.