

90. Hermann Stetter: Enzymatische Mikroanalyse des Fluor-Ions.

[Aus dem Chemischen Institut der Universität Bonn.]

(Eingegangen am 25. Februar 1948.)

Die starke Schädigung der Kartoffelphosphatase durch das Fluor-Ion wurde in ihrer Abhängigkeit vom p_{H} , der Temperatur, der Fermentkonzentration und der Substratkonzentration untersucht. Durch Variation dieser Faktoren gelang es, die Fluor-Empfindlichkeit des Ferments erheblich zu steigern und den Einfluß des größten Teils der anderen Ionen weitgehend auszuschalten. Es wurde so ein Mikro-nachweis des F^- gefunden, der darauf beruht, daß die F^- -Schädigung bei p_{H} 3.8 ein Maximum zeigt; die Empfindlichkeit beträgt 0.02 γ /ccm. Ferner wurde eine Mikrobestimmung für F^- ausgearbeitet, die es gestattet, F^- -Mengen von 0.05–1 γ mit einer Genauigkeit von ± 0.001 –0.01 γ je nach dem Bereich der Eichkurve zu bestimmen. Die Genauigkeit auf eingewogenes F^- bezogen beträgt $\pm 1\%$. Störend wirken vor allem die Ionen TiO^{++} , Al^{+++} , Be^{++} und MoO_4^{--} . Die Störung durch Al^{+++} und TiO^{++} wurde dadurch ausgeschaltet, daß dem Ferment von vornherein eine größere Menge Al^{+++} und TiO^{++} zugesetzt wurde. Die Anwendung dieser Mikrobestimmungsmethode für F^- auf die Bestimmung des F^- im Trinkwasser und im pflanzlichen und tierischen Material wird beschrieben.

Die starke Schädigung, die das F bei den Fermenten aus der Gruppe der Esterasen bewirkt, legt den Gedanken nahe, eine Nachweis- und Bestimmungsmethode des Fluor-Ions auf dieser Grundlage auszuarbeiten. Bereits 1908 wurde von S. Amberg und A. S. Loevenhart¹⁾ ein Nachweis des F in Lebensmitteln mit Hilfe von Lipasen vorgeschlagen. Da nun ein großer Teil anderer Ionen ebenfalls einen starken Einfluß auf die Esterasen ausübt und außerdem die verschiedensten organischen Verbindungen eine Beeinflussung dieser Fermente ergeben, ist dieser Nachweis in der vorgeschlagenen Form nur mit größtem Vorbehalt als spezifisch für F zu bezeichnen.

Die von E. Pfankuch²⁾ entdeckte Kartoffelphosphatase ist ebenfalls sehr empfindlich gegen F; sie kann durch fraktionierte Tanninfällung nach der Methode von B. Helferich und H. Stetter³⁾ sehr leicht in Form von haltbaren Trockenpräparaten gewonnen werden. Auch dieses Ferment ist gegenüber den verschiedensten Ioneneinflüssen sehr empfindlich. Es bestand nun die Absicht, einen spezifischen qualitativen Nachweis für F auf Grund der Schädigung des Ferments durch das F auszuarbeiten und die Beeinflussung des Ferments durch F quantitativ zu erfassen, um mit Hilfe der sich daraus ergebenden Kurve umgekehrt eine quantitative Erfassung der F-Menge zu ermöglichen. Hierzu aber war es nötig, den größten Teil des Einflusses der fremden Ionen soweit auszuschalten, daß eine Störung einer F-Bestimmung nicht mehr eintritt. Zu diesem Zweck wurde versucht, durch Änderung der Spaltungsbedingungen eine Steigerung der Empfindlichkeit des Ferments gegenüber F zu erreichen. Es wurde der Einfluß der Temperatur, des p_{H} , der Fermentkonzentration und der Substratkonzentration untersucht. Als Bestimmungsmethode wurde die genaue und bequem durchführbare Jodometri-

¹⁾ Journ. biol. Chem. 4, 149 [1908].²⁾ Ztschr. physiol. Chem. 241, 34 [1936].³⁾ A. 558, 234 [1947]; 560, 191 [1948].

sche Bestimmung des aus Phenylphosphat abgespaltenen Phenols in der von Helferich und Stetter³⁾ beschriebenen Form gewählt. Der Spaltungsansatz beträgt 4.00 ccm (2.00 ccm Substrat-Puffer-Lösung + 1.00 ccm der F^- -haltigen Lösung + 1.00 ccm Ferment-Lösung). Als Vergleichsansatz wird an Stelle von 1.00 ccm der zu bestimmenden Lösung 1 ccm bidestilliertes Wasser angewandt. Der Ionen-Einfluß wird in % Schädigung gemessen, wobei unter % Schädigung die Abnahme der Spaltung unter dem Einfluß der zugesetzten Ionen zu verstehen ist, ausgedrückt in % der Spaltung des Vergleichsansatzes ohne Ionenzusatz, z.B.: Spaltungsgrad des Vergleichsansatzes (Jodverbrauch 5.00 ccm) 100.0%; Spaltungsgrad des Ansatzes unter Ionenzusatz (Jodverbrauch 3.00 ccm). 60.0%; Schädigung = 40.0%.

Da die Kartoffelphosphatase im Gegensatz zu vielen anderen Fermenten gegen den Einfluß der Wasserstoff-Ionen-Konzentration verhältnismäßig unempfindlich ist, ist es möglich die Fermentwirkung auch weit außerhalb des optimalen pH-Bereiches von 5.2 (bei höherwertigen Präparaten bis zu pH 6.2 verschoben) zu verfolgen. Eine Abänderung des pH-Werts ergab eine starke Steigerung der Empfindlichkeit des Ferments gegenüber F^- beim Übergang zu niedrigen pH-Werten, wobei bei pH 3.8 ein deutliches Maximum der Schädigung auftrat. Zugleich verschwindet ein großer Teil des Einflusses der anderen Ionen. Dieses Empfindlichkeits-Maximum bei pH 3.8 ist spezifisch für F^- .

Die Veränderung der Temperatur zeigt eine deutliche Zunahme der F^- -Schädigung mit sinkender Temperatur. Bei einer Substratkonzentration von 0.1–0.05 mol. liegt ebenfalls ein Maximum der Schädigung. Die Erhöhung der Fermentkonzentration ergibt dagegen eine nur geringe Abnahme der Schädigung, während der Spaltungsgrad fast ohne Einfluß auf den Schädigungsgrad ist.

Als günstigster pH-Wert für die Bestimmung des F^- wurde pH 4.1 gewählt, da bei dem an sich günstigeren pH-Wert von 3.8 eine zu starke Beeinflussung des Ferments durch kleine Mengen von Al^{+++} , Be^{++} und MoO_4^{--} eintritt. Die Spaltungstemperatur beträgt 20° bei einer Substratkonzentration von $\frac{1}{20}$ mol. und einer Spaltungszeit von 2 Stdn. Die Fermentmenge wird so gewählt, daß der Spaltungsgrad unter den angegebenen Bedingungen etwa 11% beträgt; dies entspricht einer Fermentmenge von etwa 15 P.E.

Da eine Menge von 0.5 γ F^- als mittlere Bestimmungsmenge angenommen wird, wurde der Einfluß einer größeren Anzahl von Ionen auf das Ferment in einer Menge von 100 γ gleich der 200-fachen Menge der mittleren zu bestimmenden F^- -Menge unter den gewählten Bedingungen untersucht. In den meisten Fällen kann die angegebene Menge an Fremd-Ionen um das Vielfache überschritten werden, ohne daß eine Beeinflussung des Ferments eintritt. Sie beträgt in manchen Fällen das mehr als 2000-fache der mittleren Bestimmungsmenge des F^- . In allen Fällen, in denen beabsichtigt ist, das F^- i. Ggw. größerer Mengen Fremd-Ionen als hier angegeben zu bestimmen, empfiehlt es sich, für das betreffende Fermentpräparat durch einige Spaltungsansätze unter Zugabe steigender Mengen des betreffenden Ions die Toleranzgrenze zu bestimmen. Unter Toleranzgrenze soll die Menge an Fremd-Ionen verstanden werden, die

eben noch keine Beeinflussung der Fermentwirkung unter den gewählten Spaltungsbedingungen ergibt.

Pro Spaltungsansatz bzw. 1.00 ccm der zu bestimmenden Lösung ergeben keine Störung in einer Menge

bis 100 γ : Li⁺, Na⁺, NH₄⁺, K⁺, Rb⁺, Cs⁺, Mg⁺⁺, Ca⁺⁺, Sr⁺⁺, Ba⁺⁺, Y⁺⁺⁺, La⁺⁺⁺, Ce⁺⁺⁺, Cr⁺⁺⁺, Mn⁺⁺, Co⁺⁺, Ni⁺⁺, Cu⁺⁺, Ag⁺, Zn⁺⁺, Cd⁺⁺, Tl⁺, Sn⁺⁺, Pb⁺⁺, SbO⁺, Bi⁺⁺⁺, Cl⁻, Br⁻, J⁻, CO₃⁻, SO₄⁻, NO₃⁻, CN⁻, BO₃⁻, ClO₃⁻, ClO₄⁻, SO₃⁻, S⁻, S₂O₈⁻, S₂O₃⁻, Kieselsäure, Essigsäure, Oxalsäure, Weinsäure, Citronensäure,

bis 50 γ : Fe⁺⁺, Hg⁺⁺, Hg⁺, Zr⁺⁺⁺⁺, U⁺⁺, Th⁺⁺⁺⁺, PO₄⁻, AsO₃⁻,

bis 25 γ : Fe⁺⁺⁺, Tl⁺⁺⁺, Sn⁺⁺⁺⁺, AsO₄⁻,

bis 15 γ : UO₂⁺⁺, VO₄⁻,

bis 2.5 γ : Al⁺⁺⁺, Be⁺⁺, MoO₄⁻,

bis 1 γ : TiO⁺⁺.

NO₂⁻ macht die jodometrische Bestimmung unmöglich.

Störend wirken vor allem TiO⁺⁺, Al⁺⁺⁺, Be⁺⁺ und MoO₄⁻, wenn ihre Menge über der oben angegebenen Toleranzgrenze liegt. Die Störung durch Al⁺⁺⁺, die in einer Aktivierung besteht, läßt sich dadurch ausschalten, daß man der Ferment-Lösung von vornherein eine größere Menge Al⁺⁺⁺ zusetzt und die Eichkurve für diesen Fall gesondert bestimmt. Die Empfindlichkeit des Ferments gegenüber F⁻ sinkt in diesem Falle auf die Hälfte bis ein Drittel; 100 γ Al⁺⁺⁺ wirken nicht mehr störend.

Die Störung durch TiO⁺⁺ kann durch Zusatz größerer Mengen Ammoniumoxalat beseitigt werden. Es erwies sich jedoch als vorteilhafter, auch in diesem Falle der Ferment-Lösung von vornherein Titanammoniumoxalat, OTi(O₂C·CO₂·NH₄)₂·H₂O, + Ammoniumoxalat zuzusetzen und die Eichkurve auch hier gesondert zu bestimmen. Die Toleranz gegenüber TiO⁺⁺ beträgt in diesem Falle 25 γ Titan. Die Empfindlichkeit des Ferments gegenüber F⁻ ist in diesem Falle nicht erniedrigt. Für den selteneren Fall der gleichzeitigen Anwesenheit von größeren Mengen Titan und Aluminium kann die Eichkurve unter vorherigem Zusatz von Titan und Aluminium bestimmt werden.

Der Mikronachweis des F⁻ gestaltet sich so, daß man die F⁻-Schädigung des Ferments bei pH 3.5, 3.8 und 4.1 bestimmt und zugleich den Schädigungsgrad einer mit Schwefelsäure abgerauchten Probe ermittelt. Ein Maximum der Schädigung bei pH 3.8 und ein Verschwinden oder Kleinerwerden der Schädigung in der abgerauchten Probe zeigt F⁻ an. Die Empfindlichkeit des Nachweises beträgt 0.02 γ /ccm. In vielen Fällen kann mit dem Nachweis zugleich die quantitative Bestimmung erfolgen.

Zur quantitativen Mikrobestimmung des F⁻ wird für das betreffende Fermentpräparat eine Eichkurve mit Hilfe von Lösungen mit bekanntem F⁻-Gehalt ermittelt. Der Meßbereich umfaßt Fluorid-Konzentrationen von 0.05 γ /ccm bis 1 γ /ccm. Die Genauigkeit der Bestimmung beträgt ± 0.001 – 0.01 γ /ccm bei Durchführung als Doppelbestimmung je nach dem Meßbereich der Kurve. Bezogen auf eingewogenes F⁻ beträgt der maximale Fehler $\pm 1\%$. Der besondere Vorteil dieser Bestimmungsmethode beruht darauf, daß man durch Veränderung der Spaltungsbedingungen es in der Hand hat, die Methode auch ganz speziellen Bedürfnissen anzupassen. So ergibt sich z.B. die Möglichkeit, auch kleinere Mengen F⁻ als 0.05 γ /ccm quantitativ zu erfassen, wenn man die Bestimmung bei pH 3.8 durchführt. In diesem Falle gelingt es, Mengen von 0.02 bis 0.1 γ /ccm mit einer Genauigkeit von ± 0.001 γ zu bestimmen, wobei allerdings die vorhandenen Mengen an Al⁺⁺⁺, Be⁺⁺ und MoO₄⁺⁺ nicht größer als 1.5 γ sein dürfen.

Der Zeitbedarf dieser Bestimmung beträgt 3 Stdn. Der Arbeitsbedarf ist dagegen klein. So kann ein einzelner an einem Arbeitstage leicht 20 Doppelbestimmungen durchführen. Die Aufarbeitung von 1 l Kartoffelsaft ergibt eine Fermentmenge, die für etwa 1000 Einzelbestimmungen ausreicht.

Der Anwendungsbereich dieser Methode erstreckt sich auf die Bestimmung von ionogenem Fluor. Organisch gebundenes Fluor muß nach einer der üblichen Mikroverbrennungsmethoden in ionogene Form überführt werden. Das in den Komplexen AlF_6^{--} , SiF_6^{--} und TiF_6^{--} gebundene Fluor kann ohne Zerstörung des Komplexes nach dieser Methode bestimmt werden. Das in Form von BF_4^- vorliegende Fluor kann erst nach Zerstörung des Komplexes im alkalischen Milieu bestimmt werden.

Besonders einfach gestaltet sich die Bestimmung des F^- im Trinkwasser. Die Bestimmung kann in diesem Falle ohne Vorbehandlung (Konzentrierung) erfolgen. Als störende Ionen kommen Al^{+++} , TiO^{++} und Fe^{+++} in Betracht. In den meisten Fällen liegt die Menge dieser Ionen allerdings unter der Toleranzgrenze, wie der qualitative Nachweis des Fluors zeigt. Auch für die Bestimmung von F^- in tierischem und pflanzlichem Material eignet sich eines der üblichen Veraschungsverfahren. Ein besonderer Vorteil liegt in dem geringen Substanzbedarf.

Inwieweit diese neue Methodik der enzymatischen Mikroanalyse auch für die Bestimmung anderer Ionen, u.U. auch unter Verwendung anderer Fermente benutzt werden kann, soll noch geprüft werden.

Hrn. Professor B. Helferich spreche ich für die Ermöglichung dieser Arbeit und die in jeder Weise gewährte Unterstützung meinen tiefempfundenen Dank aus. Ein weiterer Dank gilt dem Kuratorium des Liebig-Stipendiums für die zuteil gewordene Unterstützung.

Beschreibung der Versuche.

Bestimmungsmethodik.

Verwendete Lösungen: $\frac{1}{5}$ mol. und $\frac{1}{10}$ mol. Dinatriumcitrat-Lösung, $\frac{1}{5}$ mol. Citronensäure-Lösung, 7.5-proz. Kaliumcarbonat-Lösung, 5 n H_2SO_4 , etwa $\frac{1}{50}$ n J (Titer-einstellung unnötig), $\frac{1}{50}$ n $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$. Sämtliche Puffer-Lösungen wurden mit bidestilliertem Wasser angesetzt; die Lösungen mit Citronensäure wurden unter kleinen Mengen Toluol aufbewahrt.

Substrat-Puffer-Lösung. Lösung A: 2.14 g Mononatrium-phenylphosphat (nach Helferich und Stetter³⁾) in 100 ccm $\frac{1}{5}$ mol. Citronensäure-Lösung; Lösung B: 2.14 g Mononatrium-phenylphosphat in 100 ccm $\frac{1}{5}$ mol. Dinatriumcitrat-Lösung.

Für Ansatz p_H 3.5: 8 Tle. Lösung A + 2 Tle. Lösung B,
für Ansatz p_H 3.8: 6.5 Tle. Lösung A + 3.5 Tle. Lösung B,
für Ansatz p_H 4.1: 5 Tle. Lösung A + 5 Tle. Lösung B.

Bei Verwendung anderer Salze der Phenylphosphorsäure ändern sich die Zahlen entsprechend. Die Lösungen können einige Wochen unter Toluolzusatz im Eisschrank aufbewahrt werden.

Darstellung der Fermenttrockenpräparate von 20–100 P.E./mg: 3 g des Präparats aus der fraktionierten Acetonfällung nach Helferich und Stetter³⁾ werden in 150 ccm $\frac{1}{10}$ mol. Dinatriumcitrat-Lösung gelöst und eine Lösung von 0.2 g Natriumsulfit in wenig Wasser hinzugegeben. Unter öfterem Umschütteln und Zerdrücken der größten Teilchen wird die Lösung 3 Stdn. stehengelassen und dann durch ein Faltenfilter abfiltriert (infolge schlechten Filtrierens Zeitbedarf von mehreren Stdn.). Zum Filtrat werden darauf 4 ccm 2-proz. Tannin-Lösung (bei eiweißreichen späten Sorten bis zu 10 ccm) unter gutem Umrühren zugegeben. Nach 20 Min. wird der Niederschlag abzentrifugiert und mehrmals mit wenig Wasser gewaschen. Dieser Niederschlag ist praktisch fermentfrei und wird verworfen. Die weiteren Fällungen werden mit je 4 ccm Tannin-Lösung durchgeführt, bis das Filtrat auf weiteren Tanninzusatz keinen Niederschlag mehr ergibt. Die Fällungen werden mit wenig Wasser gewaschen; die letzte Fällung enthält praktisch das ganze Ferment. Sie wird durch mehrmalige Behandlung mit Aceton tanninfrei erhalten.

Nach dem Trocknen im Vakuumexsiccator stellt das Fermentpräparat ein weißes bis graues Pulver dar, dessen Aktivität je nach der Kartoffelsorte zwischen 20 und 100 P.F./mg liegt. Die Aufbewahrung erfolgt im Exsiccator über Natriumhydroxyd. Auf eine Verwendung höherwertiger Präparate wurde verzichtet, da diese nur geringe Haltbarkeit aufweisen.

Ferment-Lösung: Eine abgewogene Menge Fermenttrockenpräparat wird mit soviel $\frac{1}{10}$ mol. Dinatriumcitrat-Lösung versetzt, daß in je 1.00 ccm eine Fermentmenge vorhanden ist, die unter den Spaltungsbedingungen etwa 1.5 mg. Phenol abspaltet (etwa 15 P.F.). Die Lösung wird 2 Stdn. im 20°. Thermostaten unter öfterem Umschütteln aufbewahrt und dann abfiltriert; dieses Filtrat bleibt 48 Stdn. zur Bestimmung benutzbar. Die Herstellung der Ferment-Lösung hat mit besonderer Sorgfalt zu erfolgen; die Zeit ist unbedingt einzuhalten.

Spaltungsansatz: 2.00 ccm Substrat-Puffer-Lösung + 1.00 ccm der zu untersuchenden F⁻-haltigen Lösung bzw. 1.00 ccm bidest. Wasser zum Vergleichsansatz werden in einen 50 ccm-Erlenmeyer-Kolben einpipettiert und in einen 20°. Thermostaten gebracht. Nach 10 Min. wird die ebenfalls im Thermostaten vorgewärmte Ferment-Lösung (1.00 ccm) einpipettiert und für eine sofortige Durchmischung gesorgt. Es erweist sich als zweckmäßig, die Zugabe der Ferment-Lösung im genauen Abstand von 3 Min. vorzunehmen. Nach dem Verschließen mit einem Gummistopfen wird durch drehende Bewegung in geneigter Lage die Wand des Kölbchens gleichmäßig benetzt. Nach 120 Min. wird mit 5 ccm 7.5-proz. Kaliumcarbonat-Lösung abgestoppt. Sofort nach der Durchmischung werden 10.00 ccm $\frac{1}{50} n$ J zugegeben und nach 25 Min. mit 3 ccm 5 n H₂SO₄ angesäuert. Nach dem Ansäuern wird sofort mit $\frac{n}{50}$ Na₂S₂O₃ unter Benutzung einer 10 ccm-Mikrobürette zurücktitriert. Die Genauigkeit der Bestimmung hängt ganz wesentlich von der genauen Einhaltung dieser Bestimmungsvorschrift ab. Auch hier sind die Zeiten unbedingt einzuhalten. Hat man mit der Anwesenheit von Thallium oder größeren Mengen Eisen zu rechnen, so hat die Titration unter Einleiten von Kohlendioxyd zu erfolgen.

Blindproben: 1.) 2.00 ccm Substrat-Puffer-Lösung + 5.00 ccm Kaliumcarbonat-Lösung, Zugabe von 10.00 ccm Jod-Lösung und anschließend 1.00 ccm Ferment-Lösung. 2.) 2.00 ccm Substrat-Puffer-Lösung + 1.00 ccm der zu untersuchenden F⁻-haltigen Lösung + 5 ccm Kaliumcarbonat-Lösung, Zugabe von 10.00 ccm Jod-Lösung und anschließend 1.00 ccm Ferment-Lösung. Ein Aufbewahren der Blindproben unter den gleichen Bedingungen wie die eigentlichen Spaltungsansätze erübrigt sich, wie durch zahlreiche Kontrollen festgestellt wurde. Das Ansäuern mit 5 n H₂SO₄ hat auch hier nach genau 25 Min. zu erfolgen.

pH-Abhängigkeit der F⁻-Schädigung: Die Ansätze betragen 4.00 ccm (2.00 ccm Substrat-Puffer-Lösung + 1.00 ccm der F⁻-haltigen Lösung + 1.00 ccm Ferment-Lösung). Der Spaltungsgrad wurde durch Veränderung der Zeit etwa gleich groß gehalten.

Tafel 1. Abhängigkeit der F⁻-Schädigung vom pH. 0.5 mg Ferment, 20°, 1.21 γ F⁻

pH	Jodverbr. Vergleichsansatz		Spaltungsgrad	Jodverbr. bei Zusatz von F ⁻		Spaltungsgrad	Schädigung
3.56	2.85	2.86	100%	1.63	1.63	57.1%	42.9%
3.75	2.71	2.71	"	1.45	1.47	53.8%	46.2%
3.86	3.08	3.09	"	1.69	1.72	55.3%	44.7%
4.10	3.21	3.23	"	2.03	2.00	62.6%	37.4%
4.51	3.13	3.15	"	2.56	2.53	81.0%	19.0%
5.21	3.42	3.40	"	3.13	3.12	91.6%	8.4%

Tafel 2. Temperaturabhängigkeit der F⁻-Schädigung. Spaltungsgrad durch Variation der Zeit etwa gleich groß, pH 4.10, 0.5 mg Ferment, 0.722 γ F⁻.

Temperatur:	10°	15°	20°	25°	30°
Schädigung:	31.4%	30.7%	28.5%	25.0%	20.3%

Tafel 3. Variation der Substratkonzentration. Temp. 20°, pH 4.10, Ferment-Lösung 18 P.E./ccm, 0.722 γ F⁻.

Substratkonzentration:	0.4 mol.	0.2 mol.	0.1 mol.	0.05 mol.	0.025 mol.
Schädigung:	19.1%	25.0%	30.1%	27.9%	26.7%

Tafel 4. Variation der Fermentkonzentration. Temp. 20°, pH 4.10, Spaltungsgrad etwa gleich groß, Ferment-Lösung 18 P.E./ccm, 0.722 γ F⁻.

Ferment-Lösung unverd.	27.8% Schädigung
Ferment-Lösung verd. 1:1	29.6% „
Ferment-Lösung verd. 1:3	31.7% „

Nachweis des F⁻: Es werden je 2 Spaltungsansätze (1 Ansatz mit bidest. Wasser und 1 Ansatz mit der zu untersuchenden Lösung) bei pH 3.5, 3.8 und 4.1 angesetzt. Die zu untersuchende Lösung wird nach Prüfung auf größere Mengen Al⁺⁺⁺, Be⁺⁺ und MoO₄⁺ in der entsprechenden Verdünnung zugegeben. Die Spaltungszeit wird so variiert, daß ungefähr ein gleicher Spaltungsgrad erreicht wird; Zeitverhältnis etwa 4:2:1. Ein Teil der zu untersuchenden Lösung wird mit Schwefelsäure im Platintiegel abgeraucht und in der gleichen Verdünnung bei pH 3.8 oder 4.1 bestimmt. Ein Maximum der Schädigung bei pH 3.8 und die Aufhebung oder das Kleinerwerden der Schädigung in der abgerauchten Probe zeigt F⁻ an. Bei Anwesenheit von störenden Mengen Al⁺⁺⁺, Be⁺⁺ und MoO₄⁻⁻⁻ tritt kein Maximum der Schädigung auf. Die abgerauchte Probe zeigt in diesem Falle eine Aktivierung gegenüber dem Vergleichsansatz. Tritt infolge der Gegenwart größerer Mengen störender Ionen kein deutliches Maximum der Schädigung auf, so ist das Kleinerwerden der Schädigung in der abgerauchten Probe beweisend.

Quantitative Bestimmung des F⁻: Zur Mikrobestimmung werden 1–6 mg der zu untersuchenden Probe in einem 1000 ccm-Meßkolben unter Verwendung von bidest

Tafel 5. Eichkurven für 2 verschiedene Fermentpräparate.

γ F ⁻	Jodverbrauch in ccm			Spaltung	Schädigung
	Präp. I: 18 P.E./mg, pH 4.1; Zeit: 120 Min.				
—	4.80	4.81	4.80	100.0%	—
1.182	3.09	3.11		64.6%	35.4%
1.034	3.23	3.22		67.2%	32.8%
0.887	3.37	3.38		70.3%	29.7%
0.739	3.53	3.54		73.6%	26.4%
0.591	3.73	3.72		77.6%	22.4%
0.444	3.94	3.94		82.1%	17.9%
0.296	4.18	4.15		86.8%	13.2%
0.148	4.45	4.45		92.7%	7.3%
0.074	4.62	4.64		96.4%	3.6%
	Präp. II: 34 P.E./mg				
—	5.50	5.51	5.51	100.0%	—
1.182	3.18	3.17		57.6%	42.4%
1.034	3.35	3.32		60.5%	39.5%
0.887	3.53	3.55		64.2%	35.8%
0.739	3.75	3.75		68.0%	32.0%
—	5.54	5.56	5.55	100.0%	—
0.591	4.06	4.06		72.8%	27.2%
0.444	4.33	4.31		77.8%	22.2%
0.296	4.66	4.65		83.9%	16.1%
0.148	5.03	5.02		90.5%	9.5%
0.074	5.27	5.24		94.7%	5.3%

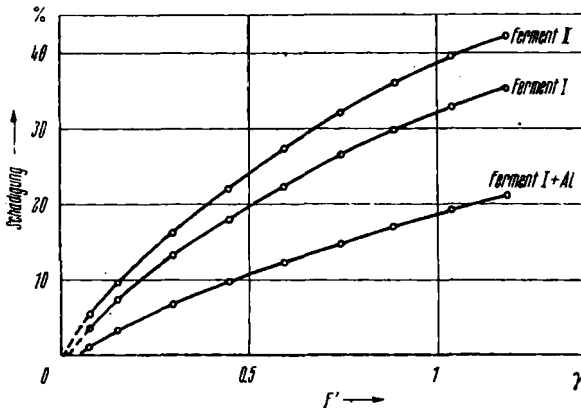
Wasser gelöst. 1.00 ccm dieser Lösung wird dann zur Bestimmung benutzt. Die Einwaage wird so gewählt, daß je 1 ccm 0.1–1 γ F⁻ enthalten ist. Zur Eichung der Fermentpräparate wurde analysenreines Natriumfluorid verwendet. Es werden etwa 2 mg Na-

triumfluorid eingewogen und in einem 1000 ccm-Meßkolben überführt. Durch entsprechende Verdünnung werden verschiedene Konzentrationen an F⁻ hergestellt. In den meisten Fällen genügt es, für ein Fermentpräparat die Eichkurve bis 1 γ einmal durch Bestimmung von etwa 8 Kurvenpunkten genau festzulegen. Für eine u.U. spätere Nach-eichung kommt man mit der Hälfte der Kurvenpunkte aus. Es empfiehlt sich, einen großen Vorrat an bidest. Wasser herzustellen und alle Lösungen in größerer Menge anzusetzen, um eine Konstanz der Versuchsbedingungen für die einzelnen Bestimmungen zu gewährleisten. Nach dem Neuansetzen von Lösungen muß mit einer Lösung von bekanntem F⁻-Gehalt die unveränderte Lage der Kurve kontrolliert werden. Bei einer festgestellten Verschiebung ist die Kurve neu zu bestimmen. Handelt es sich um Proben, bei denen der Gehalt an fremden Ionen nicht bekannt ist, so hat mit der quantitativen Bestimmung der qualitative Nachweis zugleich zu erfolgen. Störende Mengen an fremden Ionen machen sich durch eine Beeinflussung des Ferments in der abgerauchten Probe bemerkbar, wobei Al⁺⁺⁺, Be⁺⁺ und MoO₄⁻ eine Aktivierung des Ferments bewirken: Hat man mit größeren Mengen höherwertiger Ionen zu rechnen oder sind CrO₄⁻ und MnO₄⁻ vorhanden, so muß die zu bestimmende Lösung vorher reduziert werden.

Tafel 6. Eichkurve unter Zusatz von Aluminium.

Der Substrat-Puffer-Lösung wurden 0,5 mg Aluminium(III)-sulfat/ccm zugesetzt.
Fermentpräparat I.

γ F ⁻	Jodverbrauch in ccm			Schädigung
	4.95	4.97	4.95	—
1.182	3.91	3.91		21.0%
1.034	3.99	4.01		19.2%
0.887	4.11	4.11		17.0%
0.739	4.23	4.23		14.6%
0.591	4.36	4.35		12.0%
—	5.00	5.01	5.00	—
0.444	4.51	4.52		9.7%
0.296	4.68	4.67		6.5%
0.148	4.85	4.82		3.3%
0.074	4.95	4.95		1.0%



Abbild. Eichkurven für 2 verschiedene Fermentpräparate.

Eichkurve unter Titan-Zusatz: Der Substrat-Puffer-Lösung wurden 0.15 mg Titanammoniumoxalat + 1.0 mg Ammoniumoxalat/ccm zugesetzt. Die Menge des Fermentpräparats muß um etwa 1/4 erhöht werden. Die Kurve entspricht mit geringen Abweichungen der Kurve ohne Zusatz von Titan.

Eichkurve unter Zusatz von Aluminium und Titan: Es wurden 0.5 mg Aluminium(III)-sulfat + 0.15 mg Titanammoniumoxalat + 1 mg Ammoniumoxalat/ccm des Substrat-Puffer-Gemisches zugesetzt. Die Kurve entspricht bis auf geringe Abweichungen der Kurve mit Aluminium-Zusatz.

Bestimmung von F⁻ in Wasser: Man prüft mit der Nachweisreaktion auf F⁻. Tritt in der mit Schwefelsäure abgerauchten Probe keine Beeinflussung der Fermentwirkung ein, dann sind keine störenden Mengen an fremden Ionen vorhanden und die quantitative Bestimmung kann in diesem Falle mit dem Nachweis zugleich erfolgen. Tritt in der abgerauchten Probe eine Aktivierung ein, so ist Aluminium in störender Menge vorhanden. Die Bestimmung muß in diesem Falle mit Hilfe der Eichkurve unter Aluminium-Zusatz erfolgen. Bei einer Schädigung in der abgerauchten Probe muß auf störende Mengen von Fe⁺⁺⁺ (starke Blaufärbung mit Tannin) und Titan geprüft werden. Die Probe muß gegebenenfalls reduziert oder die Eichkurve unter Titan-Zusatz gewählt werden. Zur Reduktion wurden 1 mg metallisches Calcium/ccm angewandt, nachdem zuvor die entsprechende Menge Salzsäure zugegeben worden war. Die Volumenänderung muß dabei berücksichtigt werden. Durch eine Bestimmung mit synthet. fluorfreiem Wasser, das durch Verbrennen von reinem Wasserstoff in einer Quarzapparatur erzeugt wird, überzeuge man sich davon, daß der F⁻-Gehalt des bidest. Wassers unterhalb der Nachweisbarkeitsgrenze liegt. Ist das nicht der Fall, so hat die Festlegung der Eichkurve unter Verwendung von synthet. Wasser zu erfolgen.

Tafel 7. Bestimmung von F⁻ in Wasser.
Verwendung des Fermentpräparates II.

	PH 3.5	PH 3.8	PH 4.1	PH 4.1 abgerauchte Probe	Gef.
I) Leitungswasser Bonn	6.1%	11.3%	10.1%	keine Schädigung	0.162 γ F ⁻ /ccm
II) Leitungswasser Siegburg	1.4%	2.1%	3.8%	0.8% Aktivierung	
Verwend. der Al-Kurve Ferment-Präparat I			0.6%		0.061 γ F ⁻ /ccm

Bestimmung des F⁻ in pflanzlichem und tierischem Material: Der Aufschluß kann nach einem der üblichen Veraschungsverfahren erfolgen. Es wurde in der Hauptsache nach dem Veraschungsverfahren von H. v. Zehmen⁴⁾ gearbeitet. Die Einwage beträgt 50–500 mg Trockensubstanz; Zugabe von 20–100 mg Calciumoxyd. Nach der Aufnahme in der abgemessenen Menge bidest. Wasser (je nach der gewünschten Verdünnung 10–100 ccm) wird mit Schwefelsäure neutralisiert. In der Folge wird so verfahren wie bei der F⁻-Bestimmung im Wasser.

Bestimmung des F⁻ im menschlichen Blut: Es wurden 220 mg eingewogen, nach der Veraschung in 10 ccm bidest. Wasser aufgenommen und zentrifugiert; darauf wurde die Lösung neutralisiert.

Bestimmung mit dem Fermentpräparat II.

PH 3.5	PH 3.8	PH 4.1	abgerauchte Probe PH 4.1	Gef.
0.3%	1.2%	0.7%	keine Schädigung	0.013 γ/ccm = 0.14 γ F ⁻

Dies entspricht einem F⁻-Gehalt von 63.7 γ F⁻ %.

Vergleichsweise wurden von H. Hartmann, E. Chytrek und R. Ammon⁵⁾ 27–74 γ F⁻ % und von K. Kraft und R. May⁶⁾ 59–108 γ F⁻/100 ccm gefunden.

⁴⁾ Angew. Chem. 57, 159 [1944].

⁵⁾ Ztschr. physiol. Chem. 265, 52 [1940].

⁶⁾ Ztschr. physiol. Chem. 246, 242 [1937].

Analysenbeispiele.

Ferment-Präparat I. Gegebene Menge auf 100 ccm aufgefüllt; 1 ccm zur Best. gegeben.						
Gegeben	Jodverbrauch in ccm				Schädigung	Gefunden
	Vergleichs-Ansatz		Best.-Ansatz			
9.71 γ F ⁻ + 50 mg CuSO ₄	4.93	4.93	4.69	4.70	4.8%	9.8 γ
19.42 γ F ⁻ + 10 mg Borsäure	4.93	4.93	4.48	4.46	9.3%	19.3 γ
48.54 γ F ⁻ + 100 mg Zn-Acetat + 100 mg MgSO ₄	4.93	4.93	3.98	3.98	19.3%	48.7 γ
70.92 γ F ⁻ + 7 mg NH ₄ SCN	4.81	4.82	3.59	3.58	25.6%	70.7 γ
102.8 γ F ⁻ + 50 mg MnCl ₂ + 70 mg Pb(NO ₃) ₂	4.81	4.82	3.27	3.25	32.3%	101.3 γ
Ferment-Präparat II.						
14.57 γ F ⁻ + 5 mg K ₃ AsO ₄	5.63	5.62	5.10	5.10	9.3%	14.5 γ
38.84 γ F ⁻ + 2 mg Al ₂ (SO ₄) ₃	5.63	5.62	4.51	4.49	20.0%	39.0 γ
47.28 γ F ⁻ + 50 mg Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₆ · 6 H ₂ O	5.63	5.62	4.31	4.32	23.3%	47.5 γ
50.17 γ F ⁻ + 7 mg HgCl ₂	5.46	5.46	4.14	4.12	24.4%	50.4 γ
55.41 γ F ⁻ + 200 mg KCr(SO ₄) ₂ · 12 H ₂ O	5.46	5.46	4.04	4.02	26.2%	55.7 γ
Fermentpräparat I, vorheriger Zusatz von Aluminium.						
38.84 γ F ⁻ + 60 mg Al ₂ (SO ₄) ₃	5.05	5.07	4.63	4.63	8.5%	38.5 γ
48.54 γ F ⁻ + 100 mg Na ₂ SO ₃	5.05	5.07	4.54	4.54	10.3%	48.4 γ

Ferment-Präparat II.

Sbst.	Einwaage	Schädigung	% Fluor	
			ber.	gef.
CaF ₂	1.425 mg	30.4%	48.7%	48.3%
BaF ₂	1.478 mg	17.2%	21.7%	21.5%
(NH ₄) ₂ TiF ₆	1.063 mg	27.9%	57.6%	57.2%
(NH ₄) ₃ AlF ₆	1.079 mg	28.6%	58.5%	58.6%
KBF ₄ nach Eindampfen mit 20 mg Ca(OH) ₂	1.480 mg	35.8%	60.4%	59.9%

91. Sigurd Olsen: Über eine Untersuchung in der Dreikohlenstoffreihe und zwei neue Wege zur Synthese des Glycerins*).

(Unter Mitarbeit von Luise Kühn und Claus-Dietrich Friedberg.)

[Aus dem Chemischen Institut der Universität Göttingen.]

E ngegangen am 5. Februar 1948.)

In Fortführung einer früheren Untersuchung über die Umsetzung von Formaldehyd mit Äthylen in Gegenwart von Eisessig und Schwefelsäure wird gezeigt, daß das dabei entstehende Trimethylenglykol-diacetat auf zwei Wegen in Glycerin überführbar ist. Im Zusammenhang hiermit werden die Möglichkeiten und Bedingungen erörtert, unter denen eine Chlorierung des Trimethylenglykol-diacetats zu Carbonylverbindungen der Dreikohlenstoffreihe führt.

Wie bekannt, ist es gelungen, durch Oxydation von Paraffin zu höheren Fettsäuren und durch deren Veresterung mit Glycerin zu Fetten zu gelangen. Ein vollsynthe-

*) Vorgetragen auf der Tagung der Gesellschaft Deutscher Chemiker i. d. Brit. Zone in Bonn am 7. Oktober 1947; vergl. Vortragsref. Angew. Chem. **60**, 59 [1948].