

OCT 3 1958

ESSO TECHNICAL
LIBRARYÜBERSICHT

ZUR PAPIERCHROMATOGRAPHIE DER PHOSPHORVERBINDUNGEN

I. ANORGANISCHE PHOSPHORVERBINDUNGEN

HANS HETTLER

Chemisches Institut der Universität, Heidelberg (Deutschland)

In der Papierchromatographie anorganischer und organischer Phosphorverbindungen zeichnet sich eine gewisse Standardisierung der Arbeitsmethoden ab. Gleichzeitig werden die Verfahren in steigendem Masse zur Lösung spezieller Aufgaben herangezogen. In der vorliegenden Übersicht wird versucht, die Anwendungsbereiche der verschiedenen Verfahren gegeneinander abzugrenzen.

- A. Allgemeiner Teil
- B. Die Papierchromatographie anorganischer Phosphorverbindungen
 - 1. Die kondensierten Phosphate
 - 2. Phosphor-Sauerstoffverbindungen niederer Wertigkeitsstufen

A. ALLGEMEINER TEIL

Eine spezielle Methode der Papierchromatographie darf als leistungsfähig gelten, wenn eine scharfe Trennung der Substanzen erreicht wird und die R_F -Werte bei der Reproduktion unter konstanten Bedingungen innerhalb eines gewissen Fehlerbereichs gleich bleiben. Ganz allgemein müssen zur Reproduzierbarkeit der R_F -Werte einige Bedingungen erfüllt sein^{1,2}.

(a) Temperaturkonstanz $\pm 0.5^\circ$ im Chromatographieraum. Das Auftreten eines Temperaturgradienten im Chromatographiegefäß kann zu unregelmässiger Wanderung der Lösungsmittelfront Anlass geben. Da der Verteilungsquotient eine Funktion der Temperatur darstellt³, ist die Zusammensetzung gesättigter Phasen temperaturabhängig. Änderungen der Zusammensetzung eines Lösungsmittels bringen aber beträchtliche Abweichungen der R_F -Werte mit sich. Bei der Verwendung von Gemischen mit leichtflüchtigen Bestandteilen (Äther, konz. Ammoniak, Äthylformiat, Methanol) und leicht veresternder Säure-Alkoholgemische sollte die Arbeitstemperatur unterhalb 15° liegen.

(b) Bei jedem Chromatogramm muss mindestens eine Vergleichssubstanz (Leitchromatogramm) mitlaufen.

Treten bei einem Lösungsmittel Abweichungen > 0.02 vom gewöhnlichen R_F -Wert einer Leitsubstanz auf, so sollte das Lösungsmittelgemisch erneuert werden.

In der Papierchromatographie der Phosphorverbindungen muss man allerdings häufig mit grösseren Abweichungen (0.05 Einh.) rechnen².

(c) Die Lösungsmittelgemische sollen bei der Temperatur des Chromatographie-
raumes angesetzt und auch dort aufbewahrt werden. Der erste Lauf eines frisch
angesetzten Lösungsmittels wird besser nicht ausgewertet; erst beim zweiten Lauf
sind die R_F -Werte verlässlich. Die Gemische können in der Regel mehrere Tage benutzt
werden, aber auch bei Reihenuntersuchungen nicht öfter als 7–8 mal⁴.

(d) Nach Möglichkeit sollen gleichbleibende Laufzeiten (Steighöhen) eingehalten
werden. Die Zusammensetzung und Dicke einer aufsteigenden Flüssigkeitsschicht
kann nicht über die ganze Laufstrecke als konstant angenommen werden. Daraus
ergibt sich eine Abhängigkeit der R_F -Werte von der Steighöhe der Front⁵.

(e) Die meisten der hier behandelten Methoden sehen keine Äquilibration der
chromatographischen Papiere vor.

(f) Um vergleichbare R_F -Werte zu erhalten, verwendet man Papiere der gleichen
Fertigungsreihe.

In einigen neueren Arbeiten werden die Möglichkeiten geprüft, Trennschärfe und
Wanderungsgeschwindigkeit durch eine bestimmte Formgebung des Papiers zu
beeinflussen^{6,7}.

Papierformen

Die einfachste und verbreitetste Form stellt der in rechteckige Streifen geschnittene
Papierbogen dar (Fig. 1, Form 1). Bei dieser Form beobachtet man Rundflecke oder
eine bevorzugte Ausdehnung der Flecke in der Wanderungsrichtung.

Eine abschätzende Rechnung, die von den Standardbedingungen (1–2 mm³
einer 1% Lösung berechnet auf P ergibt einen Fleck von 1.7–2.2 cm Radius; 25 cm

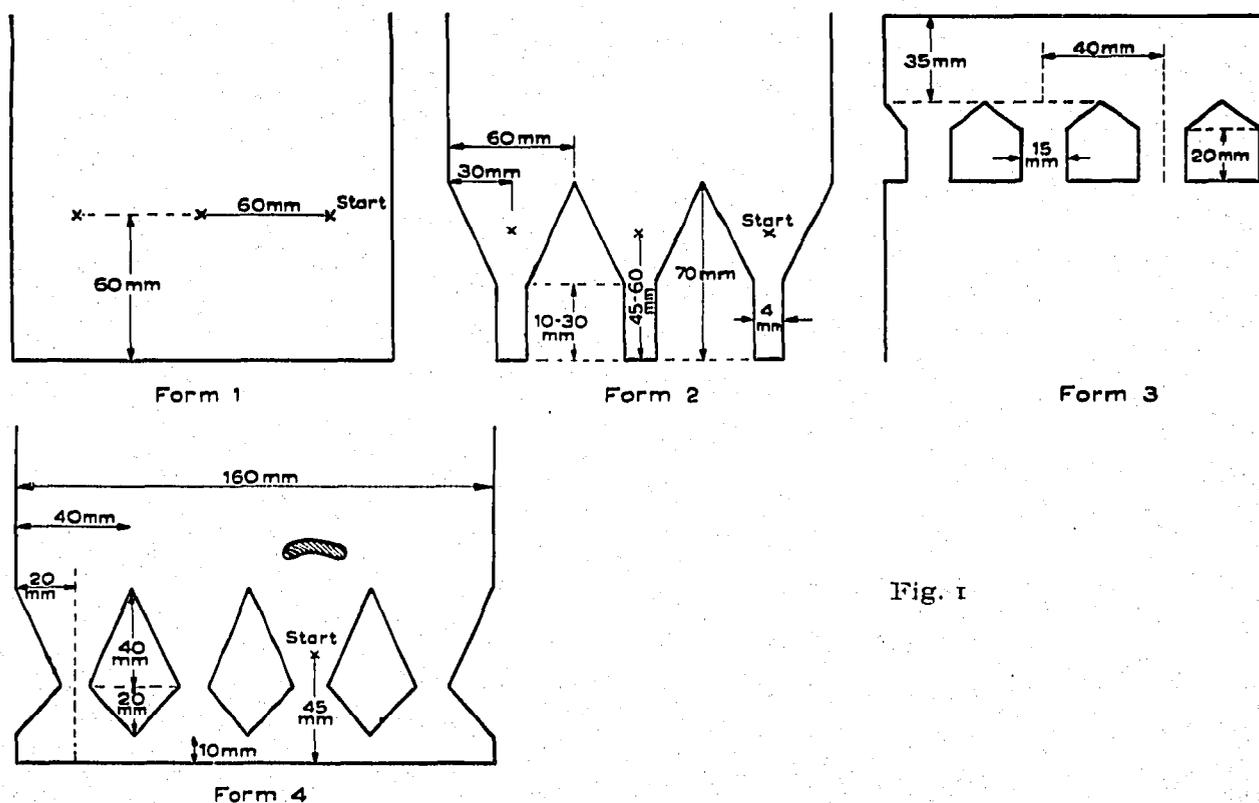


Fig. 1

Steighöhe der Front ab Startpunkt) ausgeht, fordert—um eine Überlappung der Flecke zu vermeiden—einen Mindestunterschied der R_F -Werte von 0.055. In der Praxis ist die Trennung oft für Substanzen mit einer R_F -Wertdifferenz von 0.06–0.09 recht unvollkommen⁷.

THILO UND GRUNZE⁷ führen die Zungenform (Form 2)^{6,8} in die Chromatographie der Phosphate ein. Bei Anwendung dieser Form liegt die Hauptausdehnung des Flecks parallel zur Lösungsmittelfront, also senkrecht zur Wanderungsrichtung.

Die Trennschärfe ist gegenüber Form 1 erheblich verbessert, man muss aber mit einer verlängerten Laufzeit rechnen.

Für die absteigende Chromatographie bietet eine von SCHWERDTFEGER⁹ vorgeschlagene Form (Form 3) einen erhöhten Trenneffekt bei wenig verlängerter Laufzeit.

Wir untersuchten verschiedene neue Formen unter dem Gesichtspunkt der erreichten Trennschärfe, des Arbeitsaufwands und der verlängerten Laufzeit auf ihre Brauchbarkeit.

Alle neuen Formen haben gemeinsam, dass die Wanderung des Lösungsmittels betrachtet werden kann als ein Vorgang, wie er sich ähnlich im Rundfilterchromatogramm abspielt. Das Lösungsmittel durchwandert, von einem Mittelpunkt ausgehend, ein Kreissegment, erfasst die aufgetragene Substanz und gibt dabei Anlass zu dem bekannten Verdünnungseffekt¹⁰.

Auf Grund dieser Vorstellung wählten wir eine Form (Form 4), die nach unseren Erfahrungen Vorteile gegenüber den früheren Formen aufweist. Auch hier werden optimale Trennungen mit der Rundfiltermethode erreicht^{11, 40}.

Trennschärfe und Form der Flecke. Störungen

Substanzen mit einem R_F -Wert < 0.6 treten bei Anwendung der neuen Formen, falls sie von mitwandernden Substanzen unbeeinflusst bleiben, in einer charakteristischen Nierenform auf (s. Form 4). Bei Substanzen mit einem hohen R_F -Wert, insbesondere bei Substanzen, die in Front wandern, entartet der Fleck zu einer geraden Linie.

R_F -Werte und Form der Flecke können beeinflusst werden durch Verdrängungs- und Randeffekte.

Bei unseren Untersuchungen zur chromatographischen Identifizierung von Reaktionsprodukten mit aliquoten Anteilen konnten deutliche Verdrängungseffekte beobachtet werden. Die Flecke verteilten sich dabei im Sinne maximaler Trennung, d.h. sie nahmen die Form und Fläche an, die eine Überlappung vermied. Ein typisches Verdrängungschromatogramm kann auftreten bei Substanzen, die unter den Bedingungen der Chromatographie Hydrolyse erleiden.

Auf den äusseren Bahnen der Chromatogramme, die den Gefässwänden am nächsten kommen, beobachtet man bisweilen Verschiebung und Verlagerung der in Randnähe wandernden Substanzen zum Rand hin oder ein ungleichmässiges Fortschreiten der Lösungsmittelfront.

Bei niedriger Arbeitstemperatur tritt dieser, wohl durch Temperatureinflüsse mitverursachte Effekt zurück.

Bei analytisch wichtigen Chromatogrammen empfiehlt es sich daher, die beiden Aussenbahnen nicht zu verwenden⁴.

Die quantitative Chromatographie vermeidet Störungen dieser Art durch folgende Anordnung der Substanzen:

Die eine Aussenbahn bleibt frei, die andere Aussenbahn wird mit der Testlösung, die daran anschliessende, innere Bahn mit der Untersuchungslösung besetzt. Zwischen diesem sogenannten Teststreifen, der für sich entwickelt wird und den Bahnen, die quantitativ ausgewertet werden sollen, bleibt wieder eine Bahn frei⁴.

Störungen der Papierchromatographie von Phosphorverbindungen

Eine ganze Reihe störender Effekte machen sich in der Papierchromatographie von Phosphorverbindungen bemerkbar.

- (a) Überladen der Flecke (overloading)^{12, 13}
- (b) Streifenbildung (streaking)
- (c) Verzögerungsschatten (lagging shadows)¹⁴
- (d) Schwänze (tailing)
- (e) Doppelflecke, Mehrfachflecke (multiple zones)
- (f) Hemmung, Verbleiben am Start.

Zu (a). Ionische Substanzen dürfen nur bis zu einer gewissen, individuell verschiedenen Menge aufgetragen werden, sonst treten Störungen durch den Überladungseffekt auf. Man nimmt an, dass über die Laufstrecke des Chromatogramms in der Laufrichtung ein kontinuierlicher Abfall des Wassergehalts auftreten müsste¹⁵. Eine hohe Ionenkonzentration an irgend einer Stelle bringt nach dieser Auffassung einen höheren Wassergehalt an dieser Stelle und eine veränderte Verteilung mit sich. Die R_F -Werte liegen in diesem Falle zu hoch. Der untere Rand des Flecks entspricht der normalen Wanderung, während der Schwerpunkt und die obere Grenze stark variieren können¹⁶. Wenn der Wassergehalt kontinuierlich abnimmt, kann man verstehen, dass schwerer lösliche Salze allmählich ausfallen und damit Streifenbildung einsetzt.

Streifenbildung ergibt sich auch, wenn das Lösungsmittel zu schnell wandert und es nicht zur Einstellung des Verteilungsgleichgewichts kommt.

Ein weiterer Überladungseffekt tritt auch bei nichtionisierten Substanzen auf¹². Das wandernde Lösungsmittel kann die aufgetragenen Substanzen nur bis zu einer bestimmten Konzentration mit sich führen. Wird diese Konzentration überschritten, so bleibt die überschüssige Substanz zurück und bildet "Schatten" aus.

Störungen, die durch Ionen verursacht werden. Die oben beschriebenen störenden Effekten können aber auch von der Einwirkung mehrwertiger Ionen herrühren.

Das gewöhnliche Bild der von Fremdionen verursachten Störungen sind verwaschene, schlecht getrennte Flecke, die meistens irgendwie deformiert sind (Hufeisen etc.). Wahrscheinlich gehen auch die Aufspaltungen der Flecke auf diese Ursache zurück. Störende Kationen treten (1) als Spuren im Papier, (2) als Lösungsmittelgenossen der Phosphorverbindungen oder (3) als Kationen der Phosphate auf. Zur Entfernung störender Ionen im Papier wird das Papier—meist mit Säurezusatz—

gewaschen. Bei Säurezusätzen wird nachgewaschen, bis keine Säure mehr nachgewiesen werden kann. Gegen Schwermetallspuren wird H_2S -Zusatz im Chromatographiegefäß oder das Waschen des Papiers mit einem Komplexbildner empfohlen¹⁴. Bei der Verwendung von Whatman-Papieren kann auf ein Auswaschen mit 8-Oxychinolinlösung^{14, 17} oder Versene (Äthylendiamintetraessigsäure)¹⁸ nicht verzichtet werden.

EGGLESTON UND HEMS fügen auch dem Lösungsmittel etwas Versene bei¹⁸.

Fremdionen als Lösungsmittelgenossen der Phosphate sind eine häufige Erscheinung sowohl bei Analysen technischer Produkte (Seifen, Waschmittel) als auch bei der Aufarbeitung biologischen Materials. Eine Behandlung mit Kationenaustauschern entfernt störende Kationen und führt die Substanzen in die Alkalisalze über. Wo die Behandlung mit Ionenaustauschern nicht angebracht erscheint, kann der Lösung eine Spur eines Komplexbildners (Natriumsalz der Äthylendiamintetraessigsäure, Pyridin-Äthylendinitrilotetraessigsäure)¹⁹ zugesetzt werden. Allerdings setzt man damit die R_F -Werte von Estern herab. Nach GORDON *et al.*¹² gibt man nach dem Auftragen der Substanz abschliessend Pyridinsulfatlösung auf den Auftragefleck (overspotting). Die Sulfationen halten mehrwertige Kationen fest und beeinflussen im übrigen die Wanderung der Anionen nicht.

Entwickeln der Chromatogramme

Nach dem Herausnehmen aus dem Lösungsmittel werden die Chromatogramme an der Luft getrocknet und anschliessend einige Minuten bei 60–70° im Trockenschrank⁷.

1. Standardverfahren nach HANES UND ISHERWOOD¹⁴

Für alle Arten von Phosphorverbindungen hat sich als Entwickler das Ammonmolybdatreagens nach HANES UND ISHERWOOD durchgesetzt:

5 ml 60% Perchlorsäure, 10 ml 1 N HCl und 25 ml 4% Ammonmolybdatlösung werden gemischt und mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt.

Nach dem Sprühen trocknet man in einem warmen Luftstrom und hängt dann das Chromatogramm 10 Minuten in einen Trockenschrank bei 85°.

Wir liessen Chromatogramme von Phosphorsäureestern und ähnlichen Verbindungen bei Raumtemperatur trocknen und erhitzen dann 7 min auf 70°. Nach unseren Erfahrungen ist eine völlige Hydrolyse bei dieser Trocknung eher gewährleistet, als beim raschen Wegtrocknen des Wassers.

Der Nachteil dieses Standardentwicklers liegt in seiner zerstörenden Wirkung auf das Papier, die von dem Gehalt an Perchlorsäure herrührt. Schon nach einigen Tagen beginnt das Papier zu zerfallen. Immerhin kann man die Chromatogramme, falls man keine photographische Dokumentation anwenden will, auf Papier aufgeklebt mehrere Monate verhältnismässig unversehrt aufbewahren. Um ein Nachbläuen des Chromatogramms zu verhindern, bewahrt man die Chromatogramme besser im Dunkeln auf. SANSONI hat der Anfärbung von Phosphaten auf Filterpapier eine Studie gewidmet, die Untersuchungen über die Wirksamkeit des Ammonmolybdatreagens bei wechselnder Konzentration der Bestandteile enthält²⁰. SANSONI empfiehlt ein Gemisch aus 1 Vol. wässr. 5% $HClO_4$ und 1 Vol. wässr. 1% Ammonmolybdatlösung.

Für chromatographische Reihenuntersuchungen wird das Ammonmolybdatreagens auch mit Salpetersäure als hydrolysierender Säure angewandt.

Nach PFRENGLE⁴ wird das Reagens folgendermassen hergestellt:

20 g Ammonsulfat, gelöst in 160 ml Wasser werden mit 60 ml konz. HNO_3 ($d = 1.4$) versetzt. Dann bereitet man eine Lösung aus 60 g Ammonmolybdat in 160 ml Wasser von 50° , lässt abkühlen und giesst unter Rühren langsam in die Salpetersäurelösung ein.

Zur photographischen Dokumentation vergleiche ²⁰.

Sichtbarmachung der Flecke

Die Anfärbung der Phosphorverbindung beruht auf der Reduktion der gebildeten Molybdophosphatkomplexe. Phosphorhaltige Substanzen erscheinen dann als blaue Flecke. Diese Reduktion wird von fast allen gebräuchlichen Reduktionsmitteln bewirkt.

(a) *Photoreduktion*²¹. Nach Untersuchungen von SANSONI²⁰ erreicht die Empfindlichkeit der Sichtbarmachung mit UV-Licht oder intensivem Sonnenlicht die gleiche Grenze ($0.14 \gamma/\text{cm}^2$ für $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) wie mit H_2S . Es ist leichter, gleichbleibende Bedingungen einzuhalten und Ergebnisse zu reproduzieren, wenn man photochemisch reduziert. Nach unseren Erfahrungen kann man Chromatogramme durch Liegenlassen im Sonnenlicht einwandfrei entwickeln. Das oft beobachtete Deutlicherwerden der Chromatogramme, wenn man sie nach der chemischen Reduktion dem Licht aussetzt, beruht auf der gleichen Wirkung.

Nach CROWTHER¹³ genügt es, das Chromatogramm eine Minute lang mit einer kräftigen UV-Lampe zu bestrahlen.

(b) *Reduktion mit H_2S* . In der Literatur wird empfohlen, das Chromatogramm nach der dem Sprühvorgang angeschlossenen Trocknung kurze Zeit mit Wasserdampf zu behandeln²². Bei anorganischen Phosphaten und leicht hydrolysierenden organischen Phosphorverbindungen erübrigt sich diese Behandlung.

Man lässt das Chromatogramm 5–10 min in der H_2S -Atmosphäre. Der Untergrund soll dann, wenn der Entwickler noch einwandfrei war, weiss oder leicht bräunlich sein. Man muss die Reduktion mit H_2S -Gas überwachen und das Chromatogramm aus der H_2S -Atmosphäre entfernen, bevor sich der Untergrund zu bläuen beginnt. Die beiden Verfahren werden in der qualitativen Chromatographie bevorzugt angewandt.

(c) *Reduktion mit aufgesprühten Reduktionsmitteln*. LEUTHARD UND TESTA²³ verwenden in der Chromatographie von Zuckerphosphaten 0.1% Ascorbinsäurelösung als Reduktionsmittel. Vgl. GANGULI²⁴.

WESTMAN, SCOTT UND PEDLEY berichten über Versuche mit SnCl_2 -Lösung²⁵. Auch Hydrazinhydrochlorid kann als Reduktionsmittel verwendet werden.

In der industriellen Reihenanalyse empfiehlt PFRENGLE⁴ ein Reduktionsmittel, das auch für die quantitative colorimetrische Bestimmung geeignet ist:

28.8 g $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ wasserfrei, 1.05 g Na_2SO_3 wasserfrei, 0.21 g Photorex (Monomethyl-*p*-aminophenolsulfat) werden mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt.

Diese Verfahren dienen vorwiegend zur quantitativen, colorimetrischen Bestimmung.

Die Bedenken richten sich gegen ein Verwaschen der Flecke, wie es bei mehrmaligem Sprühen doch auftreten kann.

2. Eine Variante der Ammonmolybdatmethode

wurde von VELLUZ UND PESEZ²⁶ vorgeschlagen:

Das getrocknete Papier wird mit einer salpetersauren Lösung von Ammonmolybdat besprüht, die ein wenig basisches Chininsulfat enthält. Nach der Trocknung bei 80° wird im UV-Licht untersucht. Chininphosphormolybdat bildet einen dunklen Fleck auf blau fluoreszierenden Grund.

3. Verfahren nach WADE UND MORGAN²⁷

(a) Einen grundsätzlichen anderen Weg um Phosphate sichtbar zu machen schlagen WADE UND MORGAN ein. Freie Eisen-(III)-ionen werden von Phosphorsäure-estern komplex gebunden. Nicht komplex gebundene Eisenionen gehen nachher beim Sprühen mit einer Sulfosalicylsäurelösung eine hellpurpurfarbene Komplexverbindung ein.

Man sprüht das Papier mit einer 0.1% FeCl₃-Lösung in 80% Äthanol, trocknet bei Raumtemperatur und sprüht erneut mit einer 1% Sulfosalicylsäurelösung in 80% Alkohol. Nach dem Trocknen erscheinen Phosphate als weisse Flecke auf hell purpurfarbenem Untergrund.

Das Verfahren eignet sich nur bei Anwendung saurer Lösungsmittel.

(b) Das WADE-MORGAN-Verfahren wird in etwas abgewandelter Form in neuester Zeit empfohlen:

Nach RONECKLES UND KROTKOV²⁸ taucht man die getrockneten Papiere in ein Badgemisch von 1.5 g FeCl₃·6H₂O, 3 ml 0.3 N HCl und 970 ml Aceton, trocknet im Abzug und taucht erneut in eine Lösung aus 12.5 g Sulfosalicylsäure in 1000 ml Aceton.

(c) Wenn man nach MAIR-WALDBURG¹¹ mit butylalkoholischer Eisen-(III)-rhodanidlösung arbeitet (2 Vol. 0.1% FeCl₃-Lösung, 1 Vol. 1% NH₄SCN-Lösung wird mit 3 Vol. destilliertem Butanol geschüttelt; die Butanolphase wird verwendet) kommt man mit einer Sprüfung aus.

(d) SHINAGAWA u. Mitarbeiter²⁹ sprühen zunächst mit 0.01–0.005 M Eisen-(III)-chloridlösung und dann mit 0.01–0.05 M Cyanoferrat-(II)-lösung. Auf dem Papier bildet sich Berliner Blau aus, ausser an den Phosphatflecken, die ungefärbt oder in anderen Farben erscheinen.

Zur Chromatographie ³²P indizierter Phosphate

Die radioaktiv markierten Substanzen werden zunächst nach Vorschrift papierchromatographisch oder elektrochromatographisch³⁰ getrennt. Auf dem Papier lassen sich dann die radioaktiven Flecke nach zwei Methoden bestimmen:

- (a) Durch Autoradiographie;
- (b) Nach der Auszählungsmethode.

Autoradiographie

³²P sendet eine relativ energiereiche β -Strahlung aus. Eine photographische Platte, die in direkten Kontakt mit dem radioaktiv indizierten Chromatogramm gebracht wird, schwärzt sich an den Stellen, die ³²P oder ein anderes, markiertes Element aufweisen.

Die Autoradiographie ist eine vorwiegend qualitative Methode, da die Schwärzung der Emulsion der Isotopenmenge nicht proportional ist und die Emulsion nicht linear mit der eingestrahlten Energie geschwärzt wird³¹. Bei der Autoradiographie mit ³²P können nur etwa 30% der Aktivität der Flecken nachgewiesen werden³².

Auszählungsmethode

Die Auszählungsmethode steht heute im Vordergrund, da sie einwandfreie, quantitative Bestimmungen ermöglicht. Bei der Erforschung des Intermediärstoffwechsels wird die Autoradiographie, die keinerlei technischen Aufwand erfordert, mit grossem Erfolg angewandt. Über Einzelheiten unterrichtet SANWAL³³ in *Papierchromatographie in der Botanik*.

B. DIE PAPIERCHROMATOGRAPHIE ANORGANISCHER PHOSPHORVERBINDUNGEN

I. Die kondensierten Phosphate

Die Papierchromatographie der kondensierten Phosphate wurde von EBEL in Frankreich, WESTMAN u. Mitarbeitern in Kanada und ANDO u.a. in Japan unabhängig voneinander entwickelt. Sie stellt zusammen mit der Ionenaustauschchromatographie das bevorzugte analytische Verfahren dar.

Aus den Anfängen heraus hat die Methode verschiedene analytische Aufgaben recht überzeugend gelöst:

- (a) Die Prüfung der in der Literatur beschriebenen kondensierten Phosphate auf ihre Einheitlichkeit und ihre Klassifizierung.
- (b) Die Identifizierung von Reaktionsprodukten.
- (c) Die Analyse technischer Produkte (Enthärter, Waschmittel, Lebensmittelzusätze, Gerbereihilfsmittel).

Einen Überblick über die Methode bietet die Monographie von THILO UND GRUNZE *Die Papierchromatographie der kondensierten Phosphate*⁷. Die von THILO UND GRUNZE⁷ beschriebene Arbeitsweise darf gegenwärtig als Standardvorschrift gelten, wenn auch laufend Verfeinerungen und Abänderungen der Methode beschrieben werden.

Papier

Einen Überblick über verwendete Papiere und ihre Vorbehandlung gibt Tabelle I. Gegenwärtig besteht eine gewisse Tendenz zu härteren Papiersorten, beispielsweise Schleicher u. Schüll 2045b, überzugehen³⁸. Gegen das Schrumpeln der Papiersorten nach dem Waschen wird ein anschliessendes Waschen mit 95% Alkohol empfohlen²⁸.

Arbeitsweise für Testgemische und Substanzen

Die Substanzen werden an Startpunkten auf einer Startlinie aufgetragen, die sich in 3.5–5 cm Abstand vom eintauchenden Ende des Papiers befindet. Die Startlinie wird hoch, aber auf jeden Fall in den geschnittenen Teil des Chromatogramms gelegt, weil die R_F -Werte zwar etwas kleiner, die Trennungen aber sauberer werden⁷.

Nachweisempfindlichkeit

Die untere Grenze der Nachweisempfindlichkeit dürfte bei dem von SANSONI²⁰ angegebenen Wert von $0.14 \gamma/\text{cm}^2$ für $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ liegen.

In der Praxis der Chromatographie wird die Grenze der Nachweisempfindlichkeit

TABELLE I

Papier	Literatur	Vorbehandlung
Schleicher u. Schüll 2040a	THILO UND GRUNZE ⁷	Von der Lieferfirma mit verd. Salzsäure und dest. Wasser gewaschen.
Schleicher u. Schüll 589	CROWTHER ¹³	Unvorbehandelt. S. u. S. 589 Schwarzband, rasche Trennung der Phosphate, aber Gefahr der Überladung. S. u. S. 589 Orangeband, langsames Arbeiten aber weniger Störungen.
Whatman No. 1	WESTMAN <i>et al.</i> ²⁵	Mehrtägiges Waschen mit Essigsäure und Nachwaschen mit dest. Wasser bis zur völligen Acetatfreiheit.
Whatman No. 1 Whatman No. 4	EBEL <i>et al.</i> ³⁴⁻³⁷	Waschen mit alkoholischer 8-Oxychinolinlösung, anschliessend mit wässr. Alkohol, 2 N Essigsäure und destill. Wasser.

zwischen 0.4 und 2γ P auf den einzelnen Phosphatfleck, entsprechend zwischen 0.15 und 0.66γ Phosphor pro cm^2 Fleckengrösse angegeben^{4, 34-37}.

Testlösungen und Substanzen^{2,7}

Zu der Herstellung von Testlösungen verwendet man ausschliesslich die Natriumsalze. Wenn die Möglichkeit dazu besteht, wendet man auch bei den zu untersuchenden Substanzen die Natriumsalze an. Unlösliche Calciumphosphate werden durch Behandlung mit Versene in Lösung gebracht².

Die Testlösungen und dementsprechend auch die Untersuchungslösungen werden allgemein so eingestellt, dass sie 0.1% (bis 1%) an Phosphor enthalten.

Zum Beispiel verwendet man als Pyrophosphatstandard eine Lösung von $0.7 \text{ g Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ in 100 ml Wasser gelöst, von der 0.001 ml – 0.01 ml entsprechend 1 – 10γ P mit einer Mikropipette¹⁰ aufgetragen werden.

Nach KARL-KROUPA² liegt die Kapazität des Chromatographiepapiers (Schleicher u. Schüll 589) für kurze Laufzeiten bei einem Gesamtgehalt von 10γ P pro Auftragsfleck. Auch bei den zu untersuchenden Phosphatgemischen sollen die aufgetragenen Mengen gering gehalten werden, um auf dem Chromatogramm kleine, gut gegeneinander abgesetzte Flecke zu erhalten.

Man kommt, auch bei Anwesenheit mehrerer Komponenten im Gemisch, mit Lösungen, die 10 – 20 mg Phosphatgemisch pro ml Wasser enthalten, aus. Davon werden wieder 0.001 – 0.01 ml aufgetragen.

Analytische Grenzen der Methode

Die Gruppe der kondensierten Phosphate umfasst Substanzen vom Kondensationsgrad $n = 1$ (Orthophosphat) bis zum Kondensationsgrad 10^6 (Kurrol'sches Kaliumsalz). Sie schliesst die ringförmigen Metaphosphate (Tri- und Tetrametaphosphat), die

Literatur S. 409/410.

kettenförmigen Oligophosphate (Kondensationsgrad 4–10) und die Polyphosphate ein.

Diese analytische Aufgabe kann nur durch Verwendung von Gruppenlösungsmitteln, die in einem bestimmten R_F -Bereich die Phosphate als Individuen oder als Gruppen mit einem mittleren Kondensationsgrad auftrennen, gelöst werden.

Aus den bisherigen Erfahrungen geht hervor, dass auch bei sorgfältiger Vermeidung der in Abschnitt A aufgeführten Fehlermöglichkeiten die R_F -Werte nicht immer exact reproduzierbar sind^{2,4}. Nach einem Vorschlag von MORTIMER³⁹ wählt man als Bezugsgrösse nicht mehr die Strecke, die die Lösungsmittelfront zurücklegt, sondern die Strecke, die eine bestimmte Substanz (Orthophosphat) vom Auftragsfleck aus zurücklegt.

Dieser sogenannte P_K -Wert (position constant) ist definiert:

$$P_K = \frac{\text{Von der Verbindung zurückgelegter Weg}}{\text{Vom Orthophosphat zurückgelegter Weg}} \times 100$$

Die THILO'sche Beziehung⁷. Trägt man die P_K -Werte der einzelnen kondensierten Phosphate (die Beziehung gilt nur für lineare Phosphate) auf gegen ihren Kondensationsgrad n (Zahl der P-Atome im Molekül), so erkennt man, dass die P_K -Werte mit steigendem Kondensationsgrad exponentiell abfallen. Dann liegen die Logarithmen der P_K -Werte, aufgetragen gegen die Zahl der P-Atome im Molekül auf einer Geraden, die der Formel genügt:

$$\log P_K = -an + b \quad (\text{THILO'sche Beziehung})$$

n = Kondensationsgrad, a und b sind charakteristische Lösungsmittelkonstanten.

Die THILO'sche Beziehung gilt mit veränderten Konstanten natürlich auch für die R_F -Werte.

Dem exponentiellen Abfall der P_K -Werte entspricht das Bild, das die kondensierten Phosphate im Chromatogramm bieten: In der Gegend des Startpunkts drängen sich die höherkondensierten Phosphate zusammen. THILO hat daher eine praktische Grenze der Wanderung definiert⁷. Die nach der THILO'schen Beziehung gewonnenen Geraden werden auf einen Wert $\log P_K = 0$, d.h. den Schnittpunkt mit der Abzisse, die ja den Kondensationsgrad bezeichnet, extrapoliert. An dieser Stelle ist der P_K -Wert = 1, d.h. die Substanz dieses Kondensationsgrades legt gerade ein Hundertstel der Orthophosphatstrecke zurück, wandert also praktisch nicht mehr.

Nicht alle angegebenen Lösungsmittel für kondensierte Phosphate genügen der THILO'schen Beziehung. Vgl. Fig. 2.

Standardgemische nach THILO⁷

Saures Lösungsmittel I von EBEL³⁷; pH = 1.5, Konstante $a = 0.20$. Standardgemisch zur Trennung niedermolekularer Poly- und Metaphosphate bis zum Tetrameren:

75 ml Isopropanol, 25 ml Wasser, 5 g Trichloressigsäure, 0.3 ml Ammoniak (20%).

Bedingungen: Aufsteigend, Temperatur 16°, 14 Stunden.

Trennleistung: Die Wanderung hört — nach der THILO'schen Festsetzung — bei einem Kondensationsgrad von ungefähr 11 P-Atomen auf. Die ersten sechs Glieder der kondensierten Phosphate besetzen 90% der vom Monophosphat durchlaufenen Strecke ($P_K = 10-100$). 9% der restlichen Strecke nehmen die Phosphate P_7-P_{11} ein.

Literatur S. 409/410.

Alle höherkondensierten Phosphate befinden sich in dem restlichen Prozent der Strecke. Im vorliegenden Fall entspricht einem Unterschied der P_K -Werte von 4.8 gerade ein Fleckenabstand von 1 cm. Die 5 Polyphosphate im P_K -Bereich 1-10 lassen sich also bereits nicht mehr definitiv trennen.

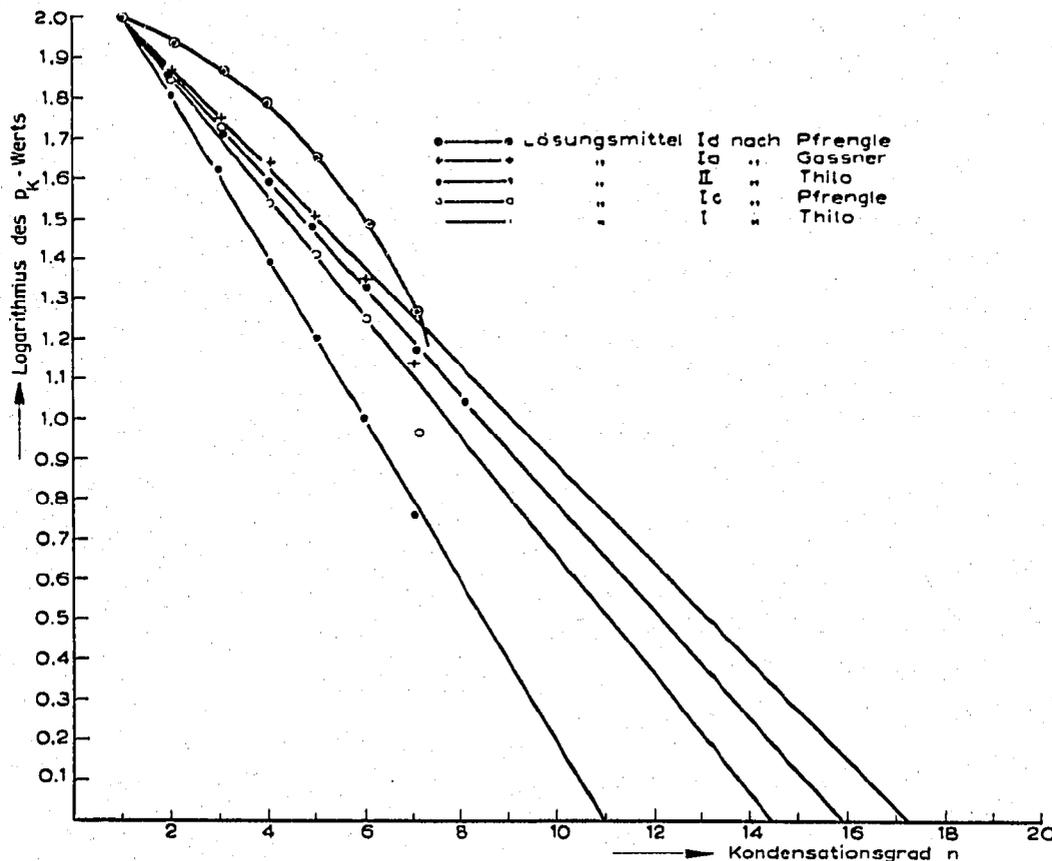


Fig. 2. Die THILO'sche Beziehung für einige Lösungsmittel (siehe Tabelle II).

TABELLE II

	L.M. I nach THILO		L.M. II nach THILO		L.M. Ia GASSNER		L.M. Ic PFRENGLE		L.M. Id PFRENGLE	
	P_K -Wert	log	P_K -Wert	log	P_K -Wert	log	P_K -Wert	log	P_K -Wert	log
Monophosphat $(PO_4)^{-3}$	100	2.000	100	2.000	100	2.000	100	2.000	100	2.000
Diphosphat $(P_2O_7)^{-4}$	63.8	1.805	72.6	1.861	73.7	1.867	71	1.851	86	1.934
Triphosphat $(P_3O_{10})^{-5}$	42.0	1.623	53.4	1.727	56.2	1.750	54	1.732	74	1.869
Tetraphosphat $(P_4O_{13})^{-6}$	24.6	1.391	39.7	1.599	43.7	1.640	35	1.544	60	1.778
Pentaphosphat $(P_5O_{16})^{-7}$	15.9	1.201	30.1	1.478	32.5	1.512	26	1.413	45	1.653
Hexaphosphat $(P_6O_{19})^{-8}$	10.1	1.004	21.9	1.340	22.5	1.352	18	1.255	31	1.491
Heptaphosphat $(P_7O_{22})^{-9}$	5.8	0.763	15.1	1.179	13.7	1.138	12.5	1.096	19	1.278
Aktaphosphat $(P_8O_{25})^{-10}$			11.0	1.041						

TABELLE III

 R_F -WERTE VON KONDENSIERTEN PHOSPHATEN

	L.M. I R_F	L.M. II R_F	L.M. Ia R_F	L.M. Ib R_F	L.M. Ic R_F	L.M. Id R_F	L.M. III R_F	L.M. IV R_F
Monophosphat (PO_4) ⁻³	0.69	0.73	0.80	0.79	0.70	0.79	0.33	0.41
Diphosphat (P_2O_7) ⁻⁴	0.44	0.53	0.59	0.62	0.50	0.68	0.24	0.31
Triphosphat (P_3O_{10}) ⁻⁵	0.29	0.39	0.45	0.53	0.38	0.58	0.24	0.31
Tetraphosphat (P_4O_{13}) ⁻⁶	0.17	0.29	0.35	0.49	0.25	0.47	(0.20)	(0.26)
Pentaphosphat (P_5O_{16}) ⁻⁷	0.11	0.22	0.26	0.44	0.18	0.36	—	—
Hexaphosphat (P_6O_{19}) ⁻⁸	0.07	0.16	0.18	0.32	0.13	0.25	—	—
Heptaphosphat (P_7O_{22}) ⁻⁹	0.04	0.11	0.11	—	0.09	0.15	—	—
Oktaphosphat (P_8O_{25}) ⁻¹⁰	—	0.08	—	—	—	—	—	—
Trimetaphosphat (P_3O_9) ⁻³	0.20	0.32	—	—	0.21	0.39	0.53	0.64
Tetrametaphosphat (P_4O_{12}) ⁻⁴	0.08	0.18	—	—	0.13	0.22	0.40	0.50

L.M. I = Lösungsmittel nach EBEL³⁷, R_F -Werte nach THILO⁷: 75 ml Isopropanol, 25 ml Wasser, 5 g Trichloressigsäure, 0.3 ml Ammoniak (20%).

L.M. II = Lösungsmittel nach THILO⁷: 70 ml Isopropanol, 10 ml Wasser, 20 ml 20% Trichloressigsäure, 0.3 ml Ammoniak (25%).

L.M. Ia = Lösungsmittel nach GASSNER⁴⁰: 80 ml Isopropanol, 5 g Trichloressigsäure, 0.3 ml Ammoniak (25%), 40 ml Wasser, 40 ml Äthylenglykolmonomethyläther.

L.M. Ib = Lösungsmittel nach GASSNER⁴⁰: 80 ml Isopropanol, 5 g Trichloressigsäure, 0.3 ml Ammoniak (25%), 70 ml Wasser, 20 ml Äthylenglykolmonomethyläther, 40 ml Dioxan.

L.M. Ic = Lösungsmittel nach PFRENGLE⁴: 26.25 ml Isopropanol, 13.75 ml Wasser, 15.6 g Trichloressigsäurelösung (bestehend aus 20 g Trichloressigsäure, 5.5 ml Ammoniak ($d = 0.918$) mit dest. Wasser auf 100 ml aufgefüllt), 3 ml Essigsäure (aus 20 ml 96% Essigsäure und 80 ml Wasser), 30 ml Dioxan.

L.M. Id = Lösungsmittel nach PFRENGLE⁴: 60 ml Methanol, 10.3 ml Trichloressigsäurelösung (100 g Trichloressigsäure auf 500 ml verdünnt und mit 22.7 ml Ammoniak ($d = 0.918$) versetzt), 5 ml Essigsäurelösung (20 ml 96% Essigsäure und 80 ml Wasser).

L.M. III = Lösungsmittel nach EBEL³⁴, R_F -Werte nach THILO⁷: 40 ml Isopropanol, 20 ml Isobutanol, 39 ml Wasser, 1 ml Ammoniak (25%).

L.M. IV = Lösungsmittel nach EBEL³⁷, R_F -Werte nach THILO⁷: 30 ml Isobutanol, 30 ml Äthanol abs., 39 ml Wasser, 1 ml Ammoniak (25%).

Saures Lösungsmittel II von THILO⁷; pH = 1.7, Konstante $a = 0.136$. Standardgemisch zur Trennung niedermolekularer und höherkondensierter Oligomeren gleichzeitig:

70 ml Isopropanol, 10 ml Wasser, 20 ml 20% Trichloressigsäure, 0.3 ml Ammoniak (25%).

Bedingungen: Aufsteigend, Temperatur 16°, 14 Stunden.

Trennleistung: Bei einem Kondensationsgrad $n = 16$ bleibt die Wanderung aus. Die R_F -Werte verteilen sich gleichmässiger als bei Gemisch I. Die ersten acht Glieder im P_K -Bereich 10–100 werden einwandfrei getrennt, während die im P_K -Gebiet 1–10 liegenden Polyphosphate P_8 – P_{16} nicht einwandfrei erkannt werden.

Die ringförmigen Metaphosphate können mit Lösungsmittel I und II nur in Abwesenheit höherer kondensierter Phosphate nachgewiesen werden.

Saures Lösungsmittel Ia nach GASSNER⁴⁰; pH = 1.7. Entspricht dem Gemisch I nach THILO:

80 ml Isopropanol, 40 ml Wasser, 5 g Trichloressigsäure, 0.3 ml Ammoniak (25%), 40 ml Äthylenglykolmonomethyläther.

Bedingungen: Aufsteigend, Temperatur 12°, 30 Stunden.

Trennleistung: Extrapolierter Kondensationsgrad, bei dem keine Wanderung mehr stattfindet = 17.

Literatur S. 409/410.

Das Gemisch nach GASSNER⁴⁰ erreicht die gegenwärtig höchste Trennleistung. In einem Polyphosphatglas mit einem Gesamt- P_2O_5 -Gehalt von 62%, entsprechend einem ungefähren mittleren Kondensationsgrad P_5 , konnten in einem Ringchromatogramm 12 Zonen, d.h. P_{11} und P_{12} unterschieden werden.

Saures Lösungsmittel Ib nach GASSNER⁴⁰; pH = 1.7. Dieses "Dioxangemisch" dient zur möglichst weitgehenden Auftrennung von Oligo- und Polyphosphatgruppen: 80 ml Isopropanol, 70 ml Wasser, 5 g Trichloressigsäure, 0.3 ml Ammoniak (25%), 20 ml Äthylenglykolmonomethyläther, 40 ml Dioxan.

Bedingungen: Aufsteigend, Temperatur 12–14°, 18–20 Stunden.

Trennleistung: Auf das Gemisch lässt sich die THILO'sche Beziehung streng genommen nicht anwenden. GASSNER⁴⁰ gibt den Grenzkondensationsgrad für die Wanderung mit $n = 20$ an. Die Oligophosphate wandern zum Teil nicht mehr als Individuen; die Oligophosphate und Polyphosphate bis über den Kondensationsgrad $n = 10$ hinaus verteilen sich sehr gleichmässig über eine Strecke von 20–30 cm.

Saures Lösungsmittel Ic nach PFRENGLE⁴. Dieses "Dioxangemisch" entspricht etwa Lösungsmittel I:

26.25 ml Isopropanol, 13.75 ml Wasser, 15.6 g Trichloressigsäurelösung (bestehend aus 20 g Trichloressigsäure, 5.5 ml Ammoniaklösung ($d = 0.918$) mit destilliertem Wasser auf 100 ml gefüllt), 3 ml Essigsäure (aus 20 ml 96% Essigsäure und 80 ml Wasser), 30 ml Dioxan.

Bedingungen: Aufsteigend, Temperatur 18–20°, 16–17 Stunden.

Trennleistung: Extrapolierter Kondensationsgrad, bei dem Wanderung unterbleibt ist 14. Die Strecken, die Monophosphat im Lösungsmittel I nach THILO und im Lösungsmittel Ic nach PFRENGLE in etwa der gleichen Zeit zurücklegt, verhalten sich annähernd wie 3:5. Das bedeutet, da im übrigen die P_K -Werte ähnlich liegen, eine günstige Verteilung der Phosphate über eine grössere Strecke.

Saures Lösungsmittel Id nach PFRENGLE⁴; "Methanolgemisch". Ein sehr schnell laufendes Gemisch zur qualitativen Orientierung:

60 ml Methanol, 10.3 ml Essigsäurelösung (100 g Trichloressigsäure auf 500 ml verdünnt und mit 22.7 ml Ammoniak ($d = 0.918$) versetzt), 5 ml Essigsäurelösung (20 ml 96% Essigsäure und 80 ml Wasser).

Bedingungen: Aufsteigend, Temperatur 20°, 4 Stunden.

Trennleistung: Die THILO'sche Beziehung lässt sich auf das Gemisch nicht anwenden. Die P_K -Werte sind fast äquidistant über die ganze Strecke verteilt. Auch eine Trennung der Metaphosphate von den Oligophosphaten ist möglich. Die auftretenden Verzögerungsschatten beeinträchtigen eine qualitative Auswertung nicht nennenswert.

Die Gefahr der Hydrolyse der kondensierten Phosphate besteht bei Lösungsmitteln mit so kurzer Laufzeit in geringerem Masse.

Ammoniakalische Standardlösungsmittel nach THILO⁷. Mit den ammoniakalischen Lösungsmitteln sollen besonders Trimeta- und Tetrametaphosphate in Gegenwart von Polyphosphaten erfasst werden.

Ammoniakalisches Lösungsmittel II nach EBEL³⁴.

40 ml Isopropanol, 20 ml Isobutanol, 39 ml Wasser, 1 ml Ammoniak (25%).

Bedingungen: Aufsteigend, Temperatur 16°, 16 Stunden.

Trennleistung: Tri- und Tetrametaphosphat wandern am schnellsten (P_K -Werte

160 u. 125). Die Trennung von Ortho- und polymerem Phosphat ist gut. Di-, Tri- und Tetraphosphat lassen sich für eine Identifizierung nicht genügend unterscheiden.

Mit diesem Lösungsmittel gelang REMY⁴¹ der chromatographische Nachweis des Phosphorigphosphats $\text{Na}_3\text{HP}_2\text{O}_6$ ($R_F = 0.49$, $P_K \sim 110$).

Ammoniakalisches Lösungsmittel IV von EBEL³⁷.

30 ml Isobutanol, 30 ml Äthanol abs., 39 ml Wasser, 1 ml Ammoniak (25%).

Bedingungen: Aufsteigend, Temperatur 16°, 16 Stunden.

CROWTHER¹³ verwendet ein Gemisch von *n*-Propanol-Ammoniak-Wasser (60:20:20) V/V.

Bedingungen: Absteigend, Raumtemperatur, 48 Stunden.

Trennleistung: Mit diesem Gemisch soll eine Trennung bis zum Kondensationsgrad $n = 9$ erreicht werden. WESTMAN war damit der chromatographische Nachweis des Tetraphosphats gelungen⁴². Ausser WESTMAN⁴³ u. Mitarbeiter bevorzugten auch einige andere Autoren die absteigende Methode, da sie gestattet, die gesamte Länge eines Bogens zur Trennung der Substanzen auszunutzen⁴⁴.

Zweidimensionale Verfahren

KARL-KROUPA² hat das zweidimensionale Verfahren von EBEL³⁶ für eine saubere Trennung der ringförmigen Metaphosphate und der kondensierten Phosphate ausgearbeitet.

Zunächst werden mit dem ammoniakalischen Lösungsmittel III auf einer Bahn die schneller laufenden Metaphosphate von den anderen Phosphaten getrennt, dann wird mit dieser Bahn als zweiter Grundlinie im nicht beanspruchten Teil des Papiers eine Vergleichslösung aufgetragen und zur Wanderung in der neuen Richtung (im sauren Lösungsmittel) angesetzt.

Man darf nach dem ersten Lauf nur bei Raumtemperatur trocknen, um Hydrolyse möglichst zu vermeiden.

VAN WAZER UND KARL-KROUPA erhielten mit dieser Methode bei Hydrolyseversuchen am GRAHAM'Schen Salz mehrere deutliche Flecke, die als die lang gesuchten, höheren Metaphosphate (Pentametaphosphat, Hexametaphosphat) gedeutet werden müssen⁴⁵.

Zur Entwicklung der Chromatogramme

Es wurden Versuche unternommen, bestimmte Verbindungen selektiv zu entwickeln. Orthophosphat zeigt sofort beim Entwickeln mit dem Ammonmolybdatreagens unabhängig von dem verwendeten Lösungsmittel eine deutliche Gelbfärbung von Molybdophosphat.

Nach der Reduktion (mit beliebigen Reduktionsmitteln) weist Orthophosphat eine grau-grüne Färbung im Unterschied zu den anderen Phosphaten auf⁷. Auch das Phosphorigphosphat zeigt nach REMY⁴¹ im Chromatogramm diese graue Farbe.

Nach einiger Zeit kann auch bei höher kondensierten Phosphaten Gelbfärbung auftreten.

Der gelbe Molybdophosphatkomplex zeigt im UV-Licht eine deutliche Fluores-

zenz, deren Intensitätsmaximum und geometrische Begrenzung sich decken mit der beobachteten Gelbfärbung im sichtbaren Licht. Die anschliessend durch die Reduktion erzeugten Phosphormolybdänblau-Flecke sind häufig verschoben und haben dementsprechend ihre Intensitätsmaxima an anderen Stellen¹³.

SANSONI²⁰ beobachtete, dass in manchen Fällen nur die Ränder des Flecks gefärbt sind, während das Innere weiss bleibt. Bei typischen Verdrängungschromatogrammen konnten wir das Gleiche beobachten. Diese Störung beruht wahrscheinlich auf einer Überladung (overloading) der Stelle, vielleicht mit ganz anderen, chromatographisch nicht erscheinenden Substanzen.

Eine frühere Arbeit von ANDO, ITO, ISHII UND SODA⁴⁶, entwickelt in mehreren Stufen: (1) Sprühen mit 4% Lösung von Ammonmolybdat in 8% Salpetersäure und Erhitzen. (2) Sprühen mit 0.05% Lösung von Benzidin in 10% Essigsäure. (3) Einwirkung von Ammoniakdampf. Dabei zeigt Pyrophosphat einen purpurroten Fleck.

Besondere Bedingungen für die Chromatographie der kondensierten Phosphate. Störungen und ihre Beseitigung

(a) *Hydrolyse.* Polyphosphate sind in mässig saurer Lösung beliebig lange Zeit praktisch unverändert beständig⁴⁷.

Die Frage, wie weit bei den kondensierten Poly- und Metaphosphaten unter den Bedingungen der Chromatographie sekundäre Veränderungen zu erwarten sind, trat beim Übergang zur quantitativen Methode in den Vordergrund.

Aus quantitativen Untersuchungen an Pyro- und Triphosphaten geht hervor, dass dieselbe Hydrolysegeschwindigkeit eingesetzt werden darf, die in wässrigen Lösungen entsprechender Acidität bzw. Basizität gemessen wurde. Es war deshalb möglich, Hydrolysekorrekturfaktoren, die aus entsprechenden Mess-Daten in wässriger Lösung gewonnen worden waren, in die quantitative Papierchromatographie einzuführen².

Die Hydrolyse fällt umsomehr ins Gewicht, je grösser die Laufzeit und je höher die Arbeitstemperatur während des Vorgangs ist. Eine ausserordentliche Zunahme der Hydrolyse kann unter dem katalytischen Einfluss von Verunreinigungen, Mikroorganismen und mehrwertiger Kationen beobachtet werden².

Unter der polarisierenden Wirkung der Felder mehrwertiger Kationen können hydrolytische Aufspaltungen und Umwandlungen der kondensierten Phosphate auftreten⁴⁸.

(b) *Störungen durch Fremdionen.* GASSNER⁴⁰ hat den Einfluss von Fremdionen in verschiedenen Konzentrationen auf die Papierchromatographie der kondensierten Phosphate in einer eingehenden Arbeit untersucht.

Es zeigte sich, dass bei fast allen Schwermetallkationen auch in geringen Mengen Störungen der chromatographischen Trennung auftreten. Wahrscheinlich überlagern sich verschiedene Wirkungen, die den Schwermetallionen zukommen (Komplexbildung, Hydrolysebeschleunigung).

Nach früheren Untersuchungen wurde für Oligo- und Polyphosphate Komplexbildung mit Metallen, auch mit den Alkalimetallen nachgewiesen⁴⁹.

Heute werden die Erscheinungen, die früher auf die Komplexbildung der Poly-

phosphate ($n > 3$) mit Kationen zurückgeführt wurden, vorwiegend als Ionenaustauschvorgänge gedeutet⁴⁷. Auch bei den Erdalkalikomplexen mit ATP, Fructosephosphat und Glycerophosphat ist der Phosphatrest der komplexbildende Teil des Moleküls⁵⁰. Solche Komplexe lassen einen andersartigen Transportmechanismus erwarten als unchelatisierte Ionen. Die ringförmigen Metaphosphate, die keine Chelatkomplexe ausbilden können⁵¹, bilden viel instabilere Komplexe als die linearen Phosphate. Im Einklang mit dieser Vorstellung beobachtet GASSNER⁴⁰ eine Wanderung des Trimetaphosphats, wenn die anderen Phosphate am Start verbleiben (Anwesenheit von Mg^{+2} , Sr^{+2} , Ba^{+2} , Zn^{+2}). Nach unseren Beobachtungen an Silbertrimetaphosphat zeichnet sich nach der Reduktion mit H_2S ein brauner Hof von Silbersulfid in rund 7 cm Abstand vom Start ab, während sich der Trimetaphosphatfleck in einem Abstand von 4.2 cm (entspricht unter normalen Bedingungen einem R_F -Wert von 0.18⁷) befindet.

LEDERER⁵² stellte bei Untersuchungen zum chromatographischen Trennungsgang fest, das Orthophosphat neben Fe^{+3} , Cu^{+2} oder UO^{+2} (in Konzentrationen von 10 mg/ml) im Butanol-Salzsäuregemisch ohne nachweisbare Beeinflussung wandert. Das Orthophosphat befindet sich zum Schluss einige cm vor der Front des Eisens.

Allerdings wird radioaktiv markiertes $H_3^{32}PO_4$, dessen Menge gravimetrisch nicht mehr erfasst werden kann, bei der chromatographischen Trennung von $Fe(III)$ -Ionen etwas zurückgehalten. Sobald mehrwertige Kationen in der Lösung vorhanden sind, verbleibt in der Regel ein mehr oder weniger grosser Teil der Phosphate (speziell am Pyro- und Trimetaphosphat untersucht) am Start⁴⁰. THILO teilt mit, dass auch Ca-Trimetaphosphat und Tetrametaphosphat ähnlich einem hochpolymeren Phosphat am Start sitzen bleiben⁵³.

Dabei ist keine sekundäre Veränderung des chromatographierten Trimetaphosphats im Spiel, wie THILO durch Ausfällung der Ca-Ionen mit Oxalat und erneute Chromatographie bewiesen hat⁵³. Vielleicht wirken die Kationen als Austausch-kationen zwischen dem Cellulosesystem mit seinen statistisch verteilten negativen Ladungen⁵⁴ und den Phosphateinheiten in Lösung, und vermitteln so die Bindung an das Papier.

Nach GASSNER⁴⁰ beseitigt ein Zusatz von Komplexon III (Dinatriumsalz der Aethylendiamintetraessigsäure) die Störungen ganz oder doch teilweise. Der störende Einfluss von Calcium bis zu 16 γ pro Fleck lässt sich durch Komplexonzusatz und anschliessende alkalische Chromatographie ausschalten. Die besten Bedingungen für die Chromatographie werden geschaffen, wenn man die Verbindungen mit Hilfe eines Kationenaustauschers in der Natrium-Form in das Na-Salz der betreffenden Säuren überführt⁵³. Nach KARL-KROUPA beseitigt die Behandlung mit Ionenaustauschern Ca-Ionen nicht völlig aus der Lösung².

Störende Anionen. Hohe Salzkonzentrationen machen sich allgemein störend bemerkbar⁴⁰. Sulfat, Sulfit und Formiat beeinträchtigen die Trennungen im alkalischen Lösungsmittel, Chromat stört besonders im sauren Chromatogramm.

Arsenat gibt einen blauen bis braunen Fleck in Orthophosphathöhe. Silikate verbleiben im überwiegend organischen Lösungsmittel als blaue reduzierte Silikomolybdänkomplexe am Start⁵⁵.

Quantitative Papierchromatographie der kondensierten Phosphate

Die quantitative Bestimmung der einzelnen kondensierten Phosphate erfordert eine besonders scharfe Trennung der Komponenten eines Gemischs. Die Flecke müssen so ausgeschnitten werden, dass der ganze Bereich des Flecks mit Sicherheit darin enthalten ist. Man verzichtet daher häufig auf die Einzelbestimmung eines jeden kondensierten Phosphats und trennt in Gruppen eines bestimmten Kondensationsbereichs auf, die in Summa bestimmt werden. Glücklicherweise ist man nicht darauf angewiesen, die Absolutmengen der einzelnen Phosphate zu bestimmen, sondern man benötigt nur das Verhältnis der Phosphatgehalte der einzelnen Flecke und kann aus einer gleichzeitig durchgeführten Gesamtphosphorbestimmung die absoluten Prozentzahlen errechnen.

Fehler, die beim Auftragen der Lösung entstehen, gehen somit nicht in die Bestimmungsmethode ein, da nur die Verhältniszahlen der einzelnen Komponenten bestimmt werden.

Die Wahl des Verfahrens (Vgl. *Die Papierchromatographie der kondensierten Phosphate*) richtet sich nach den analytischen Anforderungen.

Zunächst sollte ein qualitatives Chromatogramm über die Zusammensetzung der Probe Auskunft geben.

Zur Bestimmung geringer Mengen Orthophosphat neben kondensierten Phosphaten führt GASSNER⁴⁰ keine papierchromatographische Trennung durch, sondern photometriert das bei $\text{pH} = 4$ mit Ammonmolybdat und Ascorbinsäure erzeugte Phosphormolybdänblau. Eine quantitative Direkt-Auswertung der Phosphatfleckedurch Grössenvergleich oder Photometrierung kommt nicht in Frage, da die auf dem Papier gebildeten blauen Komplexe nicht einheitlich sind². Die quantitative Bestimmung von Phosphorverbindungen schliesst daher notwendig mehrere Schritte ein:

Loslösen der phosphorhaltigen Substanz vom Papier.

Hydrolyse zum Orthophosphat.

Überführung des Orthophosphats in Phosphormolybdänblau durch eine Reduktionslösung.

Colorimetrie.

Im einzelnen bieten sich zwei Wege an.

1. Man entwickelt einen Teststreifen, der mit dem Chromatogramm identisch ist, für sich, schneidet die entsprechenden Flecke im Chromatogramm "blind" aus und bestimmt sie quantitativ nach S. 407⁵⁶. Die Einteilung des Papiers kann nach der Vorschrift S. 392 vorgenommen werden.

Gerade für dieses "Blindverfahren" eignen sich die Lösungsmittel Ic und Ib (S. 401) mit der gleichmässigen Verteilung der Phosphate über die Laufstrecke besonders gut.

KÖBERLEIN UND MAIR-WALDBURG¹¹, die ringchromatisch arbeiten, kennzeichnen die einzelnen Phosphatringe durch Sprühen mit einer butylalkoholischen Eisenrhodanidlösung (Vgl. S. 395) und schneiden sie aus. Da anwesendes Filterpapier die

Hydrolyse nicht stört², führt PFRENGLE⁴ das Eluieren und Verkochen zu Orthophosphat in einem einzigen Arbeitsgang durch:

In einem 100 ml Erlenmeyerkölbchen werden die zerschnipfelten Papierzonen mit 50 ml 1 N H₂SO₄ über Nacht bei 90° behandelt.

Hochmolekulare Phosphate, die nach dieser Arbeitsweise nicht vollständig erfasst werden, werden 2 Stunden lang am Rückflusskühler gekocht. Nach dieser Behandlung ist vollständige Hydrolyse und Ablösung vom Papier eingetreten. PFRENGLE verwendet die Colorimetrie nach SCHEEL-LEDERLE⁵⁷, weil die Lösungen sich längere Zeit verwerten lassen und die Reduktionslösung zum Entwickeln der Teststreifen und zur Colorimetrie geeignet ist.

In anderen Arbeiten wird das Papier zunächst mineralisiert und dann die Hydrolyse der Phosphate durchgeführt¹¹.

2. Die Phosphorverbindungen werden zunächst auf dem Papier mit der Molybdänblau-Methode sichtbar gemacht.

Die ausgeschnittenen Phosphatflecke können nach dem Entwickeln durch *Extraktion* oder durch *Veraschen* des Papiers in Lösung gebracht werden. Nach KING⁵⁸ wird das Papier verascht, indem man es in einem Tropfen konz. HNO₃ eine Stunde auf 150° erhitzt (Sandbad). Die völlig klar schimmernde Lösung darf kein NO bzw. NO₂ enthalten, da Spuren dieser Verbindungen die kolorimetrische Bestimmung beeinträchtigen. Anscheinend entstehen beim Veraschen der mit Ammonmolybdatreagenz entwickelten Phosphate Verbindungen, die bei der Colorimetrie zu hohe Werte liefern¹¹.

Da sich der Molybdänkomplex in saurer Lösung schlecht löst, wird mit verd. Ammoniak extrahiert² (gewöhnlich 0.1 N Ammoniak). Dann wird mit verd. Perchlorsäure oder 8 N Schwefelsäure neutralisiert und zur Hydrolyse mit einem Überschuss der Säure versetzt. THILO und WIEKER⁷ neutralisieren gegen *p*-Nitrophenol, bevor der Phosphormolybdänkomplex erzeugt wird, da die Farbtiefe des Phosphormolybdänblaus stark vom pH der Lösung abhängig ist. Die zur Neutralisation verwendete NaOH wird in Vinidur- oder Silbergefäßen aufbewahrt, weil grössere Mengen der aus dem Glas sich herauslösenden Kieselsäure zu Fehlern bei der colorimetrischen Phosphorbestimmung führen.

Auf die Eluierung des Komplexes mit Ammoniak kann verzichtet werden, wenn man die colorimetrische Bestimmung unter exakt eingehaltenen Bedingungen für alle anfallenden Phosphatfraktionen einer Analyse durchführt². Bei der Überführung des Molybdophosphatkomplexes in die organische Phase stellt sich allerdings ein Verteilungsgleichgewicht zwischen der wässrigen Phase, dem Cellulosesystem des Papiers und der organischen Phase ein. Es gelingt, den hieraus resultierenden Minusfehler der anschliessenden colorimetrischen Bestimmung des extrahierten Phosphormolybdänkomplexes auszuschalten, in dem man jeweils genau gleich grosse Papierzonen ausschneidet und nach genau dem gleichen Verfahren extrahiert. Die so gewonnenen Verhältniszahlen der einzelnen Phosphatfraktionen lassen sich bei Kenntnis des Gesamtphosphorgehalts der Probe in die absoluten Prozentzahlen umrechnen.

Die Genauigkeit von Bestimmungen ohne anfängliche Extraktion mit Ammoniak ist gerade bei kleinsten Phosphormengen etwas geringer².

Die Extraktion des Phosphormolybdänkomplexes mit organischen Solventien (Isobutanol)

bietet den Vorteil, dass die Bestimmung des P-Gehalts nach den optischen Methoden ohne einen wesentlichen Salzfehler, d.h. ohne den Einfluss nicht absorbierender Zusätze auf die Lichtabsorption durchgeführt werden kann⁶⁰.

Ausführliche Arbeitsvorschriften werden von WIEKER⁷ und KARL-KROUPA² angegeben.

Nach THILO UND WIEKER⁷ gibt man zum Beispiel:

1. 0.06 ml 10 N H₂SO₄
2. 0.25 ml 5% Ammonmolybdatlösung
3. die neutralisierte Untersuchungslösung
4. 5 ml destilliertes Isobutanol

in einen Scheidetrichter und schüttelt mindestens 20 sec lang. Nach dem Abtrennen der wässrigen Phase wird mit 1 ml 1 N H₂SO₄ gewaschen.

Für die Reduktion zum Phosphormolybdänblau kommen verschiedene Reduktionslösungen in Frage⁶¹.

(a) SnCl₂-Lösung verwenden: WIEKER⁷, KARL-KROUPA², WESTMAN²⁵, KÖBERLEIN¹¹.

Die Gebrauchslösung nach WIEKER⁷ wird aus 0.25 ml einer Stammlösung (10 g SnCl₂ + 25 ml HCl konz.) durch Versetzen mit 25 ml 1 N H₂SO₄ täglich frisch bereitet.

(b) Reduktion mit Metol (Photorex, Monomethyl-*p*-aminophenolsulfat, vgl. S. 394 nach PFRENGLE^{4,57}.

(c) Reduktion mit Hydrazinhydrochlorid¹³.

(d) Reduktion mit Ascorbinsäure⁴⁴.

Es steht zu erwarten, dass die Ergebnisse kritischer Untersuchungen^{62,60} zur Colorimetrie des Phosphors auch die Verfahren der quantitativen Papierchromatographie beeinflussen werden.

Fehlerbreite der quantitativen Methoden

Beim Arbeiten mit Mikrovolumina und gerade beim Aufbringen der Substanzlösungen können beträchtliche Fehler entstehen. Daher umgehen einige neuere Verfahren die Bestimmung von Absolutmengen und ermitteln nur das Verhältnis der Phosphorgehalte der einzelnen Phosphatflecke^{2,40}. Die absoluten Prozentzahlen können dann aus der Gesamtphosphorbestimmung der Probe errechnet werden.

Die Mengen der zu bestimmenden Phosphate und damit die absolute Messgenauigkeit sind durch das chromatographische Verfahren festgelegt. Für eine einwandfreie chromatographische Trennung dürfen nicht mehr als 200 γ Phosphat (berechnet als P₂O₅) in dem üblichen Lösungsvolumen von 10 μ l aufgebracht werden. Die zulässigen Phosphorkonzentrationen bei der Colorimetrie richten sich nach dem verwendeten colorimetrischen Verfahren. Wenn die Probe hauptsächlich Polyphosphat enthält, das nicht wandert, kann die Einwaage etwas grösser genommen werden; bei der Bestimmung des hochmolekularen Anteils wird dann ein entsprechend geringerer Bruchteil der Lösung colorimetriert. Die gewöhnlichen Einwaagen für chromatographische Analysen entsprechen etwa 100 γ P₂O₅. Setzt man für die photometrische Bestimmung einen absoluten Fehler von 0.5 γ P₂O₅ ein, dann lässt sich die Bestimmung der Phosphatzusammensetzung mit einem absoluten Fehler von $\pm 0.5\%$

durchführen^{2, 40, 13}. Die relativen Fehler steigen bei den Komponenten eines Gemischs, die in geringer Menge vorliegen, entsprechend an.

WIEKER gibt einen maximalen relativen Fehler von 3% an. Der Phosphorgehalt des Chromatographiepapiers kann vernachlässigt werden, wenn er $0.01 \gamma \text{ P/cm}^2$ nicht überschreitet⁷.

Radioaktiv markierte kondensierte Phosphate

Messtechnische Einzelheiten der Auszählungsmethode hat MEISSNER angegeben⁶³. Die Grenze der Nachweisempfindlichkeit liegt grössenordnungsmässig bei 10^{-9} g. Zur Aufstellung einer Verteilungskurve bestimmt man mit dem Zählrohr die ³²P-Belegung des Chromatographiestreifens und trägt die gemessenen Aktivitäten in Abhängigkeit von der Entfernung vom Startpunkt (bzw. vom R_F -Wert) auf. Die Flächen unter den Maxima der Verteilungskurve sind proportional den hier konzentrierten P-Mengen. Durch eine Kurvenanalyse und Ausplanimetrieren kann man das relative Mengenverhältnis der einzelnen Phosphate unmittelbar festlegen. Zu einer Absolutbestimmung des Phosphors ist es notwendig, eine absolute Eichung der Messapparatur durchzuführen.

Die radioaktive Methode ist ein bevorzugtes Verfahren für Stoffwechseluntersuchungen mit Phosphaten⁶⁴.

2. Phosphor-Sauerstoffverbindungen niederer Wertigkeitsstufen

Die niederen Sauerstoffsäuren des Phosphors werden nach derselben Methode chromatographiert wie die kondensierten Phosphate. EBEL³⁷ stellte zunächst fest, dass in dem sauren Lösungsmittel I Hypophosphit, Phosphit, Pyrophosphit und Orthophosphat nicht getrennt werden können; dagegen ist eine Trennung dieser Gruppe von Hypophosphat oder Pyrophosphat möglich. Die Trennung Arsenit-Arsenat gelingt glatt. Auch bei dem von D'AMORE angegebenen Gemisch (70 ml Isobutanol, 6 ml Acetylaceton, 2.5 g Trichloressigsäure, 0.2 ml Ammoniak ($d = 0.91$), 39 ml Wasser) ist die Trennung unzureichend⁶⁵. Gute Trennungsmöglichkeiten bieten die alkalischen Gemische. So werden die 5 Anionen Hypophosphit, Phosphit, Pyrophosphit, Hypophosphat und Orthophosphat mit dem ammoniakalischen Lösungsmittel IV von EBEL gut getrennt. Die Trennung Arsenit-Arsenat ist allerdings nicht möglich. Auch das ammoniakalische Gemisch III findet Anwendung⁶⁵.

BONNIN UND SUE⁶⁶ führen Trennungen von Phosphat, Phosphit und Hypophosphit mit einem Gemisch *n*-Butanol-Dioxan-1 *N* Ammoniak (1:1:1) durch.

DANK

Meinem verehrten Lehrer, Herrn Priv. Doz. Dr. F. CRAMER danke ich für sein Interesse an dieser Arbeit und für seine grosszügige Förderung.

LITERATUR

- ¹ E. C. BATE-SMITH, *Partition Chromatography, Biochem. Soc. Symposia (Cambridge, Engl.)*, No. 3 (1950) 62.
- ² E. KARL-KROUPA, *Anal. Chem.*, 28 (1956) 1091.
- ³ I. W. WARK, *J. Proc. Roy Soc. N.S. Wales*, 63 (1929) 47.
- ⁴ O. PFRENGLE, *Z. anal. Chem.*, 158 (1957) 81.
- ⁵ H. HARTKAMP UND H. SPECKER, *Z. anal. Chem.*, 158 (1957) 92.
- ⁶ F. REINDEL UND W. HOPPE, *Naturwiss.*, 40 (1953) 245.
- ⁷ E. THILO UND H. GRUNZE, *Die Papierchromatographie der kondensierten Phosphate*, Akademie-Verlag, Berlin, 1955.
- ⁸ W. MATTHIAS, *Naturwiss.*, 41 (1954) 17;
W. MATTHIAS, *Der Züchter*, 24 (1954) 313.
- ⁹ E. SCHWERDTFEGGER, *Naturwiss.*, 41 (1954) 18.
- ¹⁰ F. CRAMER, *Papierchromatographie*, Verlag Chemie, Weinheim, 1958.
- ¹¹ W. KÖBERLEIN UND H. MAIR-WALDBURG, *Z. Lebensm.-Untersuch. u. -Forsch.*, 102 (1955) 231.
- ¹² H. T. GORDON, W. THORNBURG UND L. N. WERUM, *Anal. Chem.*, 28 (1956) 849.
- ¹³ J. CROWTHER, *Anal. Chem.*, 26 (1954) 1383.
- ¹⁴ C. S. HANES UND F. A. ISHERWOOD, *Nature*, 164 (1949) 1107.
- ¹⁵ S. N. TEWARI, *Naturwiss.*, 41 (1954) 229.
- ¹⁶ H. T. GORDON UND C. A. HEWEL, *Anal. Chem.*, 27 (1955) 1471.
- ¹⁷ J. P. EBEL, *Bull. soc. chim. France*, 20 (1953) 991.
- ¹⁸ L. V. EGGLESTON UND R. HEMS, *Biochem. J.*, 52 (1952) 156.
- ¹⁹ D. G. WALKER UND F. L. WARREN, *Biochem. J.*, 52 (1951) xxi.
- ²⁰ B. SANSONI, *Angew. Chem.*, 65 (1953) 423.
- ²¹ R. S. BANDURSKI UND B. AXELROD, *J. Biol. Chem.*, 193 (1951) 405.
- ²² J. FLECKENSTEIN, *Naturwiss.*, 40 (1953) 462.
- ²³ F. LEUTHARD UND E. TESTA, *Helv. Chim. Acta*, 34 (1951) 931.
- ²⁴ N. C. GANGULI, *Chem. Abstr.*, 48 (1954) 3206.
- ²⁵ A. E. R. WESTMAN, A. E. SCOTT UND I. T. PEDLEY, *Chem. in Can.*, 4 (1952) 35.
- ²⁶ L. VELLUZ UND M. PESEZ, *Bull. soc. chim. France*, 17 (1950) 868.
- ²⁷ H. E. WADE UND D. M. MORGAN, *Nature*, 171 (1953) 529.
- ²⁸ V. C. RONECKLES UND G. KROTKOV, *Arch. Biochem. Biophys.*, 70 (1957) 442.
- ²⁹ M. SHINAGAWA, J. TAKANAKA, Y. KISO, A. TSUKIJI UND Y. MATANA, *Bull. Chem. Soc. Japan*, 28 (1955) 568.
- ³⁰ T. R. SATO, W. E. KISIELSKI, W. P. NORRIS UND H. H. STRAIN, *Anal. Chem.*, 25 (1953) 438.
- ³¹ M. D. KAMEN, *Radioactive Tracers in Biology*, Academic Press, Inc., New York, 1951, S. 429.
- ³² A. A. BENSON, I. A. BASSHAM, M. CALVIN, T. C. GOODALE, V. A. HAAS UND W. STEPKA, *J. Am. Chem. Soc.*, 72 (1950) 1710.
- ³³ H. F. LINKSKENS, *Papierchromatographie in der Botanik*, Springer Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg, 1955.
- ³⁴ J. P. EBEL UND Y. VOLMAR, *Compt. rend.*, 233 (1951) 415.
- ³⁵ J. P. EBEL, *Compt. rend.*, 234 (1952) 621.
- ³⁶ J. P. EBEL, *Bull. soc. chim. France*, 20 (1953) 991, 998.
- ³⁷ J. P. EBEL, Y. VOLMAR UND B. JACOB, *Compt. rend.*, 235 (1952) 372.
- ³⁸ E. STEGER UND A. SIMON, *Z. anorg. u. allgem. Chem.*, 291 (1957) 76.
- ³⁹ D. C. MORTIMER, *Can. J. Chem.*, 30 (1952) 653.
- ⁴⁰ K. GASSNER, *Mikrochim. Acta*, (1957) 594.
- ⁴¹ H. REMY UND H. FALIUS, *Naturwiss.*, 44 (1957) 419.
- ⁴² A. E. R. WESTMAN UND A. E. SCOTT, *Nature*, 168 (1951) 740.
- ⁴³ A. E. R. WESTMAN UND J. CROWTHER, *J. Am. Ceram. Soc.*, 37 (1954) 420.
- ⁴⁴ W. H. FRANK, *Angew. Chem.*, 68 (1956) 586.
- ⁴⁵ J. R. VAN WAZER UND E. KARL-KROUPA, *J. Am. Chem. Soc.*, 78 (1956) 1772.
- ⁴⁶ T. ANDO, J. ITO, S. H. ISHII UND T. SODA, *Bull. Chem. Soc. Japan*, 25 (1952) 78.
- ⁴⁷ E. THILO, *Acta Chim. Acad. Sci. Hung.*, 12 (1957) 221.
- ⁴⁸ E. THILO UND J. GRUNZE, *Z. anorg. u. allgem. Chem.*, 290 (1957) 209.
- ⁴⁹ J. C. BAILAR, *The Chemistry of the Coordination Compounds*, Reinhold Publ. Corp., New York, Chapman & Hall, Ltd., London, 1956, S. 773;
Vgl. S. M. LAMBERT UND J. I. WATTERS, *J. Am. Chem. Soc.*, 79 (1957) 4262;
J. I. WATTERS, S. M. LAMBERT UND E. D. LOUGHRAN, *J. Am. Chem. Soc.*, 79 (1957) 3651.
- ⁵⁰ G. SCHWARZENBACH UND G. ANDEREGG, *Helv. Chim. Acta*, 40 (1957) 1229.
- ⁵¹ J. R. VAN WAZER UND D. CAMPANELLA, *J. Am. Chem. Soc.*, 72 (1950) 655.
- ⁵² M. LEDERER, *Anal. Chim. Acta*, 11 (1954) 524.

- ⁵³ E. THILO, H. G. GRUNZE, J. HÄMMERLING UND G. WERZ, *Z. Naturforsch.*, 11b (1956) 266.
E. THILO UND J. GRUNZE, *Z. anorg. u. allgem. Chem.*, 290 (1957) 223.
- ⁵⁴ W. F. PICKERING, *Anal. Chim. Acta*, 15 (1956) 337.
- ⁵⁵ E. BLASIUS UND A. CZEKAY, *Z. anal. Chem.*, 156 (1957) 7.
- ⁵⁶ K. W. GERRITSMAN UND J. C. FREDERIKS, *Chem. Weekblad*, 51 (1955) 197.
- ⁵⁷ P. LEDERLE, *Z. anal. Chem.*, 121 (1941) 403.
- ⁵⁸ L. J. KING, *Biochem. J.*, 26 (1932) 292.
- ⁵⁹ J. B. MARTIN UND D. M. DOTY, *Anal. Chem.*, 27 (1955) 401.
- ⁶⁰ E. RUF, *Z. anal. Chem.*, 151 (1956) 169.
- ⁶¹ W. FRESENIUS UND G. JANDER, *Handbuch der analytischen Chemie*, Teil III, Vaß Band, Phosphor, Springer Verl., Berlin, 1953.
- ⁶² U. BOHNSTEDT UND R. BUDENZ, *Z. anal. Chem.*, 159 (1957) 12;
N. S. GING, *Anal. Chem.*, 28 (1956) 1330;
F. L. HAHN UND R. LUCKHAUS, *Z. anal. Chem.*, 149 (1956) 172;
C. H. LUECK UND P. F. BOLTZ, *Anal. Chem.*, 28 (1956) 1168.
- ⁶³ J. MEISSNER, *Z. anorg. u. allgem. Chem.*, 281 (1955) 293.
- ⁶⁴ Vgl. K. SCHREIER UND H. G. NÖLLER, *Arch. expil. Pathol. u. Pharmacol.*, Nauryn-Schmiedeberg's, 227 (1956) 199;
I. SCHMUTTE, K. LANG, L. SCHACHINGER, O. KARGES, J. E. BLUMENBERG UND G. ROSSMÜLLER, *Biochem. Z.*, 327 (1956) 118.
- ⁶⁵ G. D'AMORE, *Ann. Chim. (Rome)*, 46 (1956) 517.
- ⁶⁶ A. BONNIN UND P. SUE, *Compt. rend.*, 239 (1952) 960.

Eingegangen den 13. März 1958