

¹⁾ ÜBER DIE PAPIERCHROMATOGRAPHISCHE BESTIMMUNG DER IN FLEISCH-
PRODUKTEN VERWENDETEN PHOSPHATE

von

M.S. Pohja

Forschungsanstalt der Genossenschaftlichen Schlachthöfe, Hämeen-
linna, Finnland

Zur Erreichung eines besseren Wasserbindevermögens des Fleisches setzt man heutzutage den Fleischprodukten Polyphosphatgemische zu. Bei Untersuchungen über den Einfluss der Polyphosphate auf das Wasserbindevermögen des Fleisches, über die Hydrolyse der zugesetzten Phosphate durch Einfluss der Brühtemperatur oder über die Anwesenheit von Polyphosphaten in den Fleischprodukten, wird man vor die Aufgabe gestellt, Phosphate sowohl qualitativ als quantitativ zu isolieren, zu identifizieren und zu bestimmen. Bei dieser Arbeit leisten die papierchromatographischen Verfahren gute Hilfe.

Die Isolierung der Phosphate aus Fleischprodukten mit Hilfe der Papierchromatographie ist verhältnismässig wenig untersucht worden. Dagegen sind Veröffentlichungen über die Papierchromatographie der reinen Ortho-, Pyro- und Polyphosphate in reichlicher Anzahl vorhanden. Die meisten der angegebenen Methoden gründen sich entweder auf eindimensionale oder auf zweidimensionale Chromatographie. Es sind auch einige Untersuchungen unter Anwendung des aufsteigenden und des Rundfilterverfahrens ausgeführt worden. Ferner ist eine grosse Anzahl verschiedener Fliessmittel für die Chromatogramme ausprobiert worden, während zur Erzeugung der Färbung der Phosphatflecken oder der Zonen nur wenige verschiedene Verfahren zur Anwendung gekommen sind.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Methoden der Phosphatchromatographie modifiziert, mit dem Ziel, eine einfache, schnelle und leichte chromatographische Methode zum Isolieren und Identifizieren sowie zur quantitativen Bestimmung der in Fleischprodukten vorkommenden Ortho-, Pyro- und Polyphosphate zu entwickeln. Des weiteren wurde eine einfachere und schnellere Färbungsmethode der Chromatogramme entwickelt.

A. Der qualitative Nachweis

1. Angewandte Verfahren

Extrahieren der Phosphate aus der Wurst: Zu 50 g gemahlener Wurstmasse werden 10 g feste Trichloressigsäure zugegeben, darauf wird im Mörser zu einer homogenen Masse vermischt. Aus der so erhaltenen Masse können leicht etwa 5 ml Lösung ausgepresst werden, die zum Chromatographieren verwendbar ist.

Entwicklung der Chromatogramme: bei den ausgeführten Arbeiten wurde chromatographisches Papier Nr. 1 von Whatman in Bogen von etwa 20 x 20 cm benutzt. Die zu untersuchende Phosphatlösung wird auf den Mittelpunkt des Bogens pipettiert, wonach sie bei Zimmertemperatur eingetrocknet wird. In der Papiermitte wird ein ca. 7 mm breiter Spalt aufgeschnitten, in den ein doppelt gebogener Papierstreifen (7 x 50 mm) eingesteckt wird. Als Fließmittel dient das Lösungsmittel Isopropanol-20%ige Trichloressigsäure-H₂O-konz. NH₃(70:20:10:0,3). Das Lösungsmittel wird auf einen Teller (Ø 16 cm) gegossen und das chromatographische Papier mit einer Glasplatte bedeckt derart daraufgelegt, dass das Lösungsmittel durch den Papierstreifen in die Papiermitte gezogen wird. Die Berührungsstelle von Glasplatte und Teller wird durch Anbringen eines aufgeschnittenen Gummischlauchs abgedichtet. Die Fließzeit beträgt etwa 2 Stunden. Dann ist das Lösungsmittel etwa 7 cm, d.h. bis auf 1 cm an den Tellerrand heran fortgeschritten. Die Trocknung erfolgt bei Zimmertemperatur. Die deutlichsten Chromatogramme ergeben sich bei Ausführen des Chromatographierens bei 20°C.

Färbung der Phosphatzonen im Chromatogramm:

Spritzreagens 1: 15 g kristallines Ammoniummolybdat werden in 100 ml dest. Wasser aufgelöst, nach erfolgter Auflösung werden 100 ml Salpetersäure (spez. Gew. 1,2) zugesetzt.

Spritzreagens 2: 0,05 g Benzidin werden in 5 ml Eisessig unter leichtem Erwärmen aufgelöst. Die Lösung wird mit dest. Wasser auf 100 ml verdünnt. Hiernach werden 10 ml konz. Ammoniak zugesetzt. Das Benzidin kristallisiert zum Teil, aber die Lösung ist dessen ungeachtet ausgezeichnet als Entwicklungslösung geeignet.

Nach Bespritzung mit der Ammoniummolybdatlösung wird das Papier bei Zimmertemperatur getrocknet, bis kein stechender Salpetersäuregeruch mehr wahrzunehmen ist. Die Phosphate sind dann als gelbe Zonen sichtbar. Beim Bespritzen mit Benzidin schlagen die Zonen schon während des Spritzens zu stark blauer Färbung um.

2. Einfluss verschiedener Faktoren auf das Chromatographieren

Wenn nicht anders angeführt, wurde bei allen ausgeführten Versuchen ein Phosphatgemisch benutzt, das Tri-Na-Orthophosphat, Tetra-Na-Pyrophosphat, Na-Tripolyphosphat und Na-Hexametaphosphat enthält.

Chromatographierte Phosphatmenge

Mit den Lösungsmitteln, die sich als die besten erwiesen haben, Isopropanol-20% Trichloressigsäure- H_2O-NH_3 (70:20:10:0,3) und $BuOH^x$ - n-HCl (2:1) können die verschiedenen Phosphate in Lösungen, die 100 μ eines jeden Phosphats enthalten, deutlich voneinander getrennt werden. Bei Phosphatmengen von 150 μ waren die Zonen bedeutend verbreitert, mit Ausnahme der vom Orthophosphat erzeugten Zone. Bei einer Phosphatmenge von 50 μ wird eine deutliche Trennung erzielt. Bei der Stoffmenge von 20 μ waren die Phosphatzonen deutlich, aber erheblich geschwächt.

Experimente mit verschiedenen Fließmitteln

Als beste unter den verschiedenen ausprobierten Entwicklerlösungen zeigte sich das Lösungsmittel Isopropanol-20% Trichloressigsäure- H_2O -konz. NH_3 (70:20:10:0,3). Seine Verwendung empfehlen auch KÖBERLEIN und MAIR-WALDBURG (18), insbesondere mit Hinsicht auf der Rundfilterchromatographie. Das Lösungsmittel ist Temperaturschwankungen gegenüber nicht sonderlich empfindlich. Die R_f -Werte der verschiedenen Phosphate bei diesem Lösungsmittel variierten in den folgenden Grenzen: Tri-Na-Orthophosphat 0,7-0,8, Tetra-Na-Pyrophosphat 0,45-0,55, Na-Tri-Polyphosphat 0,3-0,4 und Na-Hexa-Metaphosphat 0.

^{x)} $BuOH$ = Butylalkohol

Bei Anwendung des Lösungsmittels BuOH - n-HCl (2:1) variieren die Rf-Werte wie folgt: Orthophosphat 0,6-0,7, Pyrophosphat 0,4-0,5, Tripolyphosphat 0,34-0,35 und Hexametaphosphat 0. Dieses Lösungsmittel ist jedoch empfindlich gegen Temperaturvariationen und andere Umgebungsfaktoren. Bei 25°C bildeten sich undeutliche Zonen. Die Chromatographie muss somit bei niedriger konstanter Temperatur ausgeführt werden.

Einfluss von Temperatur und pH auf das Chromatographieren

Es wurde der Einfluss der Temperatur auf die Deutlichkeit des Chromatogrammes bei Anwendung des Lösungsmittels BuOH - n-HCl (2:1) untersucht. Bei 25°C wurde ein Chromatogramm mit blaugefärbtem Hintergrund und fehlendem Tripolyphosphatring erzielt. Bei 37°C ergab sich ein ebensolches, jedoch noch undeutlicheres Chromatogramm. Bei 5°C dagegen wurde ein deutliches Chromatogramm erhalten.

Der Einfluss der Temperatur ist auf die Hydrolyse der Phosphate zu Orthophosphat im Verlauf des Fließens zurückzuführen. Die Hydrolysegeschwindigkeit ist bei 25°C erheblich grösser als bei 5°C. Das Fehlen der Tripolyphosphatzone zeigt, dass dieses Phosphat viel leichter als Pyrophosphat hydrolysiert wird.

Zur Untersuchung der durch die Temperatur bewirkten Hydrolyse wurde mit einem Lösungsmittel experimentiert, welches BuOH und Wasser in gleichen Verhältnissen wie das Lösungsmittel BuOH - n-HCl (2:1) enthielt, aber HCl in verschiedenen Mengen. Aus den erzielten Chromatogrammen wurde festgestellt, dass ohne Säurezusatz die Phosphate überhaupt nicht wandern. Im pH-Bereich 1,25-1,7 wandert nur das Orthophosphat als scharfe Zone, während die anderen in der Mitte bleiben. Zu gleicher Zeit steigt der Rf-Wert des Orthophosphats mit abnehmendem pH. Wenn mit dem Mischungsverhältnis BuOH-H₂O - n-HCl (20:5:5) (pH 1,2) bei 25°C chromatographiert wurde, trennte sich das Pyrophosphat deutlich, aber das Tripolyphosphat blieb teilweise von dem Hexametaphosphat überlagert. Dagegen waren die bei dem Normalverhältnis BuOH - n-HCl (2:1) (pH 1,0) erzeugten Chromatogramme deutlich. Auf Grund dessen kann man sagen, dass der Einfluss der Temperatur auf die Hydrolyse der Polyphosphate während des Fließens auf den pH-Wert des Fließmittels zurückzuführen ist.

Bei Anwendung des Fließmittels BuOH-konz.HCl (2:1) waren die übrigen Phosphate sowohl bei 20°C als bei 10°C zu Orthophosphat hydrolysiert, weshalb in den Chromatogrammen nur die von dem Orthophosphat gelieferte Zone vorkam.

Aus dem oben Dargestellten geht hervor, dass mit zunehmendem Salz-säuregehalt des Lösungsmittels BuOH-HCl die Rf-Werte der Phosphate zunehmen. Bei kleinen HCl-Gehalten werden Phosphate mit kleinem Molekül gut getrennt, während diejenigen mit grossem Molekül ungetrennt bleiben. Bei hohen HCl-Gehalten wiederum verhält es sich umgekehrt. Das ideale Trennvermögen liegt zwischen diesen Extremen bei dem Fließmittel BuOH- n-HCl (2:1), d.h. also bei dem von KÖBERLEIN u.a. (18) angegebenen Lösungsmittel.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass eine Temperatur von etwa 25°C bei Anwendung von Mineralsäuren nachteilig auf die Deutlichkeit der Chromatogramme einwirkt, während dieser Nachteil nicht in Erscheinung tritt, wenn die Mineralsäure z.B. durch Trichloressigsäure oder andere organische Säuren ersetzt wird.

Beobachtungen über die Färbung der Phosphate im Chromatogramm

Zur Färbung der Phosphatzonen auf dem Papier ist die Hydrolyse unbedingt notwendig. Bei höherer Temperatur (z.B. 60°C) erfolgt die Hydrolyse schneller, aber dann verflüchtigt sich auch die Salpetersäure rasch, weshalb die Hydrolyse unvollständig erfolgen kann. Beim Trocknen der Chromatogramme nach dem Bespritzen bei Zimmertemperatur (20°C) hat die Salpetersäure eine lange Wirkungs-dauer und die Hydrolyse ist vollständig.

Die Hydrolyse der Phosphate auf dem Papier geht daraus hervor, dass nach der Ammoniummolybdatbespritzung zuerst das Orthophosphat sichtbar wird, dann nach 2 Minuten das Tripolyphosphat und erst später das Pyrophosphat. Das Sichtbarwerden der Zonen erfolgt somit in einer der abnehmenden Hydrolysegeschwindigkeit entsprechenden Reihenfolge.

Reinheit der Phosphate

Nur die Ortho- und Pyrophosphate waren pro analysi-Qualität. Das Tripolyphosphat (technische Qualität) enthielt Spuren von Ortho- und Pyrophosphaten. In dem mit Hexametaphosphat (100%, technische Qualität) erzeugten Chromatogramm wurden die Ortho- und Triphosphatzonen festgestellt, deren Menge zu etwa 5-10% geschätzt werden konnte.

Einfluss der Fliesszeit

Es wurden Untersuchungen zur Feststellung der Wirkung einer langen Fliessdauer (16 Std.) auf die Deutlichkeit des Chromatogramms unter Anwendung eines schmäleren Papierstreifens (3 mm) und des Fliessmittels BuOH- n-HCl (2:1) angestellt. Hierbei ergab sich ein deutliches Chromatogramm. Längere Fliessdauer wirkt sich also vorteilhaft auf die Deutlichkeit der Chromatogramme aus. Hierbei muss jedoch das Chromatographiergefäss zur Vorbeugung der Verdunstung des Fliessmittels völlig dicht sein, da sich sonst verbreiterte Zonen ergeben.

Erfahrungen bezüglich des Waschens der Papiere

Die Whatman Nr. 1 Papierbogen wurden zu Blättern von etwa 20x20 cm geschnitten und mehrere Tage in 2 n-Essigsäure gehalten, während welcher Zeit dann und wann mit einem Glasstab umgerührt wurde (HANES und ISHERWOOD (16) sowie WESTMAN u.a.(24)). Die Essigsäure wurde mit Wasser ausgewaschen bis der pH-Wert des Waschwassers nicht mehr unter pH 5 herabsank. Die Trocknung erfolgte im gleichen Waschgefäss, welches etwa 2 Tage im Heizschrank bei etwa 120°C gehalten wurde.

Bei Anwendung der gewaschenen chromatographischen Papiere war die Fliessgeschwindigkeit etwa doppelt so hoch wie mit ungewaschenen Papieren. Eine etwas grössere Schärfe der Phosphatringe konnte erreicht werden. Bei Anwendung des Lösungsmittels BuOH- n-HCl (2:1) stiegen die Rf-Werte der Phosphate erheblich infolge des Waschens, weshalb die Zonen alle nahe bei dem Rand des Lösungsmittels und nahe beieinander lagen. Die Ringe waren jedoch sehr scharf, weshalb die Trennung vollkommen war. Die Deutlichkeit der mit dem Lösungsmittel BuOH- n-HCl erzielten Chromatogramme hängt also sehr stark ausser von der Temperatur und den Temperaturschwankungen von der Reinheit des chromatographischen Papiers ab. Kein nennenswerter Einfluss des Waschens auf die Rf-Werte wurde bei Anwendung des Lösungsmittels Isopropanol-20%ige Trichloressigsäure-konz.NH₃ festgestellt.

B. Die quantitative Bestimmung

1. Angewandte Verfahren

Die quantitative Bestimmung gründet sich teilweise auf die von WESTMAN u.a. (24) und von CROWTHER (5) angewandten Verfahren. Eine Abweichung bilden jedoch die verschieden grossen Mengen des Ammoniummolybdates und des Hydrazinhydrochlorids, das Chromatographieren der Phosphate nach dem Rundfilterverfahren, das Verfahren zum Entwickeln der Phosphatzonen auf dem Papier und die Behandlung des Chromatogrammpapiers zum Zweck der quantitativen Bestimmung.

Prinzip: Die Phosphate werden mittels Schwefelsäure zu Orthophosphat hydrolysiert. Bei Anwesenheit von Ammoniummolybdat entsteht gelbes Phosphomolybdat, welches bei Reduktion mit Hydrazin eine blaue Farbe ergibt.

Lösungen zum Chromatographieren: Die gleichen wie bei der qualitativen Bestimmung der Phosphate.

Reagenzien zur kolorimetrischen Bestimmung:

- 0,1 % NH_4OH -Lösung, pro anal.
- H_2SO_4 (sp.G. 1,84) wird mit dest. Wasser im Verhältnis 1:1 verdünnt
- 5 g Ammoniummolybdat werden in dest. Wasser aufgelöst und auf 100 ml verdünnt
- 0,08 g Hydrazinhydrochlorid werden in dest. Wasser aufgelöst und auf 100 ml verdünnt

Ermittlung der Eichkurve: Es wird eine Na_2HPO_4 -Lösung (BDH, pro anal.) hergestellt, die 2 % P/1 ml Lösung enthält. (Es werden z.B. 789 mg Na_2HPO_4 /1000 ml abgewogen, hiervon 1 ml abpipettiert und diese Menge auf 100 ml verdünnt. Die endgültige Lösung enthält dann 7,89 % Na_2HPO_4 /1 ml = 2 % P/1 ml.) Die so erhaltene Lösung wird in Mengen von 1, 2, 2½, 3, 4 und 5 ml in 50 ml-Messkolben pipettiert, wobei dann die entsprechenden Phosphormengen 2, 4, 5, 6, 8 bzw. 10 % P betragen. In jeden Messkolben werden 25 ml 0,1-n NH_3 -Lösung sowie 5 ml H_2SO_4 -Lösung (1:1) gegeben. Da beim Ermitteln der Eichkurve Orthophosphat in Frage steht, erfolgt eine Hydrolyse. Hiernach werden 5 ml Ammoniummolybdat-Lösung

hinzugegeben und es wird sorgfältig geschüttelt. 5 ml Hydrazinhydrochlorid-Lösung werden zugefügt und es wird sorgfältig geschüttelt, wonach die Kolben ins siedende Wasserbad gestellt und 15 Minuten darin belassen werden. Die Kolben werden dann rasch abgekühlt und bis zur Marke mit destilliertem Wasser gefüllt. Die Intensität der entstandenen blauen Färbung wird nach 10 bis 15-minütigem Stehen mit dem Spektralphotometer PMQ von Zeiss gegen eine gleichzeitig bereitete Reagenzienkontrolle gemessen, wobei die Wellenlänge der benutzten Strahlung 830 m μ , die Spaltbreite 0,02 und die Empfindlichkeit 9 beträgt. Bei der Ermittlung der Eichkurve ergaben sich für die Phosphormengen 2,4,5,6,8 und 10 die Extinktionen 0,175, 0,349, 0,434, 0,524, 0,683 bzw. 0,896.

Die quantitative Bestimmung der Phosphate aus dem Chromatogramm

Das Chromatographieren der Phosphate erfolgte in gleicher Weise wie beim qualitativen Arbeiten. Die Phosphormenge in der zu chromatographierenden Lösung darf höchstens 10 μ g und die pipettierte Lösungsmenge höchstens 5 μ l betragen. Wenn eine stark verdünnte Lösung vorliegt, kann man mehrmals 5 μ l pipettieren und den Fleck dazwischen immer mit kaltem Luftstrom trocknen. Die Fliesszeit ist 80-90 min bei 20°C. In dieser Zeit ist der Lösungsrand bis auf ungefähr 7 cm vom Zentrum fortgeschritten. Das Chromatogrammpapier wird dann in Zimmertemperatur getrocknet und in acht genau gleichgrosse Sektoren zerschnitten. Jeder zweite Sektor wird mit den Spritzreagenzien bespritzt und in Zimmertemperatur getrocknet. Mit Hilfe der bespritzten Sektoren lässt sich auf den unbespritzten Sektoren der Ort der Phosphatzonen einzeichnen; diese werden ausgeschnitten und alle so erhaltenen vier Streifen werden in einen 50 ml-Erlenmeyerkolben gebracht. Es werden 7 ml 0,1-n NH₄OH-Lösung zugegeben und der Kolben darf unter mehrmaligem Schütteln etwa 1 Stunde stehen. 5 ml dieser Lösung werden in eine kalibrierte Reagenzröhre pipettiert, es wird 1 ml H₂SO₄ (1:1) zugegeben und die Röhre etwa 1 Stunde ins siedende Wasserbad gestellt. Hiernach wird 1 ml Ammoniummolybdat-Lösung zugegeben und geschüttelt. Es wird 1 ml Hydrazinlösung zugegeben, sorgfältig geschüttelt, und die Röhren werden genau 10 Minuten ins siedende Wasserbad gestellt. Dann wird fortgefahren wie bereits bezüglich der Ermittlung der Eichkurve dargestellt.

Berechnen der Resultate: Na_2HPO_4 (pro anal.) Mol.Gew. 142. Es werden z.B. 50 % chromatographiert. Von dieser Menge sind

$$\frac{50 \cdot 31}{142} = 10,92 \% \text{ Phosphor.}$$

Von der gesamten Menge wird die Hälfte, d.h. 5,46 % in Ammoniak extrahiert. Die Menge der Extraktlösung beträgt 7 ml, wovon 5 ml zur Bestimmung entnommen werden. Dann ist die theoretische Phosphormenge $\frac{5,46}{7} \cdot 5 = 3,89 \%$.

2. Der Einfluss verschiedener Faktoren auf die quantitative Bestimmung der Phosphate

Reagenzienmengen

Bei der kolorimetrischen Bestimmung der Phosphate wurden 5 ml der zu untersuchenden Lösung in kalibrierte Reagenzröhren von 10 ml Volumen pipettiert. Es wurde 1 ml Schwefelsäure (1:1) und nach dem Kochen 1 ml Ammoniummolybdatlösung (2,5 g/100 ml) sowie 1 ml Hydrazinlösung (0,19 g/100 ml) zugegeben. Diese Reagenzienmengen sind im Wesentlichen die gleichen wie bei dem von CROWTHER (5) angewandten Verfahren; nur das Gesamtvolumen der Bestimmungslösung ist verschieden. Bei diesem Vorgehen ergab sich eine Gerade für Phosphormengen von 0 bis 7 %, während beim Anwenden grösserer Phosphormengen die Resultate eine Streuung in weiten Grenzen aufwiesen. Aus diesem Grunde wurden Versuche unter Anwendung verschiedener Ammoniummolybdat- und Hydrazinkonzentrationen angestellt. An Hand der so erhaltenen Ergebnisse wurde eine neue Eichkurve ermittelt, indem 1 ml Ammoniummolybdatlösung (5 g/100 ml) und 1 ml Hydrazinlösung (0,08 g/100 ml) verwendet wurde. Der Unterschied zwischen den auf zwei verschiedenen Wegen gewonnenen Eichkurven geht aus Abb. 1 hervor.

Bei den Versuchen mit verschiedenen Mengen von Ammoniummolybdat und Hydrazin zeigte es sich, dass man bei der Ammoniummolybdatkonzentration 5 g/100 ml eine Hydrazinkonzentration zwischen 0,04 und 0,24 g/100 ml verwenden kann, ohne dass sich die Farbtintensität der zu messenden Lösung dadurch ändert. Dagegen erfährt bei der Ammoniummolybdatkonzentration 1,5 g/100 ml, 2,5 g/100 ml oder

7,5 g/100 ml die Intensität der Färbung infolge verschiedener Hydrazinmengen eine bedeutende Änderung. Aus Tabelle 1 und Abb. 2 geht der Einfluss der Reagenzienmengen auf die Farbintensität hervor. Die Phosphorkonzentration bei diesen Versuchen betrug 9,8^g und die Messungen erfolgten gegen eine Reagenzienkontrolle.

Tabelle 1. Der Einfluss verschiedener Ammoniummolybdat- und Hydrazinmengen auf die Intensität der entstandenen Färbung

Hydrazin- hydrochlorid g/100 ml	Extinktion			
	Ammoniummolybdat g/100 ml			
	1,5	2,5	5,0	7,5
0,04	0,031	0,492	0,892	0,945
0,06	-	0,749	-	-
0,08	0,055	0,703	0,896	0,920
0,10	-	0,583	0,905	-
0,12	-	0,600	0,918	-
0,14	-	0,514	0,910	-
0,16	-	0,570	-	-
0,18	-	0,484	-	-
0,19	0,017	0,482	0,895	1,010
0,23	-	-	0,901	-
0,28	-	-	0,908	-
0,38	-	0,172	0,916	-

Beim Anwenden der Ammoniummolybdatkonzentration 5 g/100 ml und der Hydrazinkonzentration 0,08 g/100 ml waren die Lösungen merkbar klarer als bei den anderen in Tabelle 1 angegebenen Konzentrationen.

Hydrolysierzeit

U.a. CROWTHER (5) hat festgestellt, dass eine Hydrolysierdauer von 30 min. bei 100°C (20 ml Probelösung + 5 ml 10-n H₂SO₄) hinreichend zum quantitativen Hydrolysieren aller zyklischen und Polyphosphate zu Orthophosphat ist. KARL-KROUPA (17) erwähnt, dass 20 min. eine ausreichende Hydrolysierdauer in saurer Lösung ist. Bei unseren eigenen Untersuchungen haben wir eine Hydrolysierdauer von 1 Stunde benutzt, wobei alle Meta- und Polyphosphate quantitativ zu Orthophosphat hydrolysiert werden.

Erwärmungsdauer nach dem Hydrazinzusatz

Das überschüssige Molybdat-Ion in der Bestimmungslösung kann unter gewissen Umständen reduziert werden und eine blaue Färbung ergeben. BOLTZ und MELLON (4) erwähnen, dass u.a. geringe Säurekonzentration die Intensität der entstehenden Färbung infolge der Reduktion des Molybdat-Ions erhöht. Daher wurde, da sämtliche Messungen gegen eine Reagenzienkontrolle erfolgen, auch untersucht, ob die Erwärmungsdauer nach dem Hydrazinzusatz auf die Stärke der Färbung der Kontrolle einwirkt. Die Erwärmungszeit betrug 5, 10, 15, 20 und 30 min. und die entsprechenden Extinktionsablesungen waren 0,051, 0,067, 0,082, 0,100 bzw. 0,102. Die Messungen erfolgten gegen destilliertes Wasser. Es erwies sich also, dass die Intensität der Färbung mit wachsender Erwärmungsdauer zunimmt. Daher muss, um stets vergleichbare Resultate zu zeitigen, die Erwärmungszeit bei jeder Bestimmung unbedingt gleich lang sein, von dem Zeitpunkt gemessen, zu dem die Reagenzröhren ins siedende Wasserbad gestellt werden. In allen Versuchen wurde eine Erwärmungsdauer von 10 Minuten benutzt.

Säurekonzentration

Beim Untersuchen des Einflusses der Säurekonzentration betrug die Phosphormenge 4μ und die Erwärmungsdauer nach dem Hydrazinzusatz war 10 min. Die Messungen erfolgten gegen destilliertes Wasser. Die Ergebnisse zeigten, dass sich bei dem Verhältnis $H_2SO_4 : H_2O$ gleich 1:0,25 zu niedrige Resultate ergeben und dass bei den Konzentrationen 1:0,5, 1:0,75, 1:1 und 1:1,25 die Ergebnisse untereinander der gleichen Größenordnung sind und dem theoretischen Wert am nächsten liegen, während wieder bei der Konzentration 1:1,5 die Farbe der Lösung derart blau ist, dass sie sich nicht mehr messen lässt. Dann ist also auch das Molybdat-Ion teilweise reduziert worden (4). In Verbindung mit den Versuchen wurde auch die Extinktion der gleichzeitig hergestellten Reagenzienkontrollen gegen destilliertes Wasser gemessen. Die Ergebnisse gehen in gleiche Richtung wie zuvor. Auf Grund dieser Untersuchungen benutzten wir in allen Versuchen die Säurekonzentration $H_2SO_4 : H_2O = 1:1$.

Waschen des Chromatogrammpapiers

In den Versuchen wurde chromatographisches Papier Whatman Nr. 1 benutzt. Das Waschen erfolgte nach dem zuvor auf S. 6 erwähnten Verfahren. Da es anzunehmen ist, dass in ungewaschenen Papieren mit dem Lösungsmittel Verunreinigungen vom Zentrum des Papiers auf den Rand zu wandern, wurde eine Reinheitskontrolle der Papiere derart ausgeführt, dass ein Papierbogen von 20x20 cm Grösse nach normal vorgenommenem Chromatographiervorgang vom Zentrum aus in fünf Zonen mit je dem gleichen Flächeninhalt ($=25 \text{ cm}^2$) geteilt wurde. Die Zonen wurden numeriert, auseinander geschnitten und in der Weise behandelt wie bezüglich der quantitativen Bestimmung beschrieben. Auf diese Weise wurden Bestimmungen mit gewaschenen und ungewaschenen Papieren vorgenommen. Die Ergebnisse zeigt Tabelle 2.

Tabelle 2. Der Einfluss des Waschens des Chromatogrammpapiers auf die Phosphatbestimmung.

Papierzone Nr.	Extinktion	
	Gewaschenes Papier	Ungewaschenes Papier
1 (Mitte)	0,038	0,023
2	0,035	0,015
3	0,026	0,020
4	0,063	0,031
5 (Rand)	0,046	0,036

Auf Grund der Ergebnisse kann man folgern, dass man mit gewaschenen Papieren wider Erwarten eine grössere Extinktion als mit ungewaschenen Papieren erhält. Desgleichen zeigte es sich, dass mit dem Fliessmittel im Papier vorhandene, die Färbung beeinflussende Verunreinigungen vom Zentrum nach dem Rand hin wandern. Verunreinigungen vergrössern die Extinktionsablesung. Da das Waschen des Papiers keine bessere Abhebung der Phosphate auf dem Papier herbeiführt, sondern nur die Fliesszeit verkürzt, und da die mit gewaschenen Papieren erhaltene Extinktion grösser als die bei Anwendung ungewaschenen Papiers erzielte ist, wurden in allen Versuchen die Bestimmungen mit ungewaschenen Papieren ausgeführt.

Ergebnisse aus den Phosphatbestimmungen

Da es sich beim Untersuchen der Reinheit des Papiers zeigte, dass mit dem Fliessmittel im Papier vorhandene Verunreinigungen vom Zentrum nach dem Rande hin wandern, erfolgten die Messungen gegen eine Papierkontrolle. Diese wurde derart erhalten, dass ein leeres Papier gleichzeitig mit dem mit der Phosphatprobe beschickten Papier chromatographiert wurde und von dem leeren Bogen an der der Phosphatzone entsprechenden Stelle ein Stück in Grösse dieser Zone als Kontrolle ausgeschnitten wurde. Die derart erzielten Resultate zeigten, dass sich der vom Papier herbeigeführte Fehler niemals ausschalten lässt, da man als Papierkontrolle kein völlig gleichartiges Papier finden kann wie es die Phosphatzone ist. Nach dem obenerwähnten Vorgang wurden 19 verschiedene Chromatogramme erzeugt. Bei 11 derselben war bei der Bestimmung des Phosphorgehalts der prozentuelle Fehler geringer als $\pm 10,4 \%$, bei 5 Bestimmungen geringer als $\pm 15,7 \%$ und bei 3 Bestimmungen geringer als $\pm 22,4 \%$. Die Ergebnisse sind aus Tabelle 3 ersichtlich.

Da die Genauigkeit der Messungen nach dem vorbeschriebenen Vorgang gering ausfiel und überdies die Herstellung der Papierkontrollen eine äusserst umständliche Massnahme ist, wurde eine derartige Ausführung der Bestimmung versucht, dass die Messungen gegen destilliertes Wasser erfolgten und von den erhaltenen Extinktionsablesungen das Mittel der Reagenzienkontrollen abgezogen wurde, welches sich aus 30 Bestimmungen gegen Wasser gemessen der Extinktionsablesung 0,076 gleich ergab. Auf diese Weise wurden 30 verschiedene Chromatogramme hergestellt, und der Fehler bei der Bestimmung des Phosphorgehalts war hierbei in 16 Bestimmungen geringer als $\pm 10,2 \%$, in 11 Bestimmungen geringer als $\pm 16 \%$ und in 3 Bestimmungen geringer als $\pm 20,8 \%$. Der prozentuelle Fehler war auch bei diesem Messvorgang verhältnismässig hoch. Die Ergebnisse aus diesen Bestimmungen sind aus Tabelle 3 ersichtlich.

Die von den Reagenzienkontrollen gelieferte Extinktionsablesung gegen Wasser gemessen variierte jedoch im Bereich 0,046-0,094. Derart grosse Unterschiede der Extinktionsablesungen bei wiederholtem Messen haben einen erheblichen Einfluss auf die Genauigkeit der Ergebnisse. Daher kann der Mittelwert der Reagenzienkontrollen bei den Bestimmungen nicht angewandt werden. Ebenso verhält es sich hinsichtlich der Papierkontrollen. Da auch der vom Papier

herrührende Fehler nicht zu vermeiden ist, bleibt als einzige Möglichkeit übrig, dass man den von den Reagenzienkontrollen herbeigeführten Fehler vermeidet, indem man die Messungen gegen eine gleichzeitig hergestellte Reagenzienkontrolle ausführt. In diesen Versuchen wurden 14 Chromatogramme eines Gemisches von Di-Na-Orthophosphat und Tetra-Na-Pyrophosphat hergestellt. Die Ergebnisse zeigen, dass bezüglich des Orthophosphats der prozentuelle Fehler in 8 Bestimmungen geringer als $\pm 9,1\%$, in 4 Bestimmungen geringer als $\pm 15\%$ und in 2 Bestimmungen geringer als $\pm 18\%$ war. Entsprechenderweise war für das Pyrophosphat der prozentuelle Fehler in 12 Bestimmungen geringer als $\pm 6,2\%$ und in 2 Bestimmungen geringer als $\pm 16\%$. Ferner wurden mit Di-Na-Orthophosphat allein 15 Chromatogramme hergestellt, wobei der prozentuelle Fehler in 9 Bestimmungen geringer als $\pm 8,6\%$, in 5 Bestimmungen geringer als $\pm 13,1\%$ und in einer Bestimmung geringer als $\pm 17,1\%$ war. Die Ergebnisse aus diesen Versuchen sind aus Tabelle 4 ersichtlich.

An Hand der im obigen dargestellten Resultate kann man feststellen, dass man beim Ausführen der Messungen bei der eigentlichen Bestimmung gegen eine gleichzeitig hergestellte Reagenzienkontrolle etwas bessere Ergebnisse erzielt als wenn man nach einer der beiden vorbeschriebenen Methoden verfährt.

Besprechung

In der hier beschriebenen Untersuchung sind aus Fleischverarbeitungsprodukten Phosphate nur qualitativ bestimmt worden. Quantitative Bestimmungen wurden mit reinen Phosphaten und Phosphatmischungen vorgenommen. Die Untersuchungen betreffs der quantitativen Bestimmungen der Phosphate aus Fleischprodukten sollen fortgesetzt werden.

Die papierchromatographische Bestimmung der Phosphate ist verhältnismässig umständlich. Qualitativ lassen sich nach dem in Frage stehenden Verfahren allerdings die Orthophosphate isolieren, die am weitesten vom Zentrum wandern, danach die Pyrophosphate, das Tripolyphosphat und die im Zentrum stehenbleibenden Metaphosphate. Bei der quantitativen Bestimmung darf die zu untersuchende Probe höchstens 10% Phosphor je Phosphat enthalten. Beim Arbeiten mit

so kleinen Mengen ist der relative Fehler verhältnismässig hoch. Überdies führt u.a. das Chromatogrammpapier einen Fehler herbei, der sich schwer ausschalten lässt.

Das Rundfilterverfahren ist jedoch eine einfache und rasche Methode zum Trennen der Phosphate voneinander. Aus diesem Verfahren kann z.B. ein Kontrollverfahren entwickelt werden, welches gute Hilfe leistet, wenn man untersucht, ob der Wurst Phosphate zugesetzt worden sind. Ferner lässt sich das Verfahren u.a. beim Untersuchen der Hydrolysisierung der zur Wurst zugesetzten Phosphate während des Brühens der Wurst sowie des Einflusses dieser Änderungen auf die Wasserbindung der Wurstmasse anwenden.

Der hier dargestellten Untersuchung ist kein Rückblick auf die Literatur bezüglich der papierchromatographischen Bestimmungsmethoden der Phosphate angegliedert worden, sondern es folgt nur ein Literaturverzeichnis. Die Untersuchungsergebnisse werden jedoch in zwei Abschnitten in der Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung veröffentlicht, und im Zusammenhang damit findet auch die zeitigere, mit der Papierchromatographie der Phosphate verknüpfte Literatur eine Behandlung.

Literaturverzeichnis

1. ANDO, T., J. ITO, S. ISHI u. T. SODA: Bull. Soc., Japan, 25, 78 (1952).
2. BANDURSKI, R.S. u. B. AXELROD: J. of Biol. Chem. 193, 405 (1951).
3. BERENBLUM, I. u. E. CHAIN: Biochemic. J. 32, 286 (1938).
4. BOLTZ, D.F. u. M.G. MELLON: Analyt. Chem. 19, 873 (1947).
5. CROWTHER, J.P.: Analyt. Chem. 26, 1383 (1954).
6. CROWTHER, J.P.: Nature (London) 173, 486 (1954).
7. EBEL, J.P.: C.r. Acad. Sci. (Paris) 234, 621 (1952).
8. EBEL, J.P.: Bull. Soc. chim. France 991, 998, 1089 (1953).

9. EBEL, J.P. u. Y. VOLMAR: C.r. Acad. Sci. (Paris) 233, 415 (1951).
10. EGGLESTON, L.V. u. R. HEMS: Biochemic. J. 52, 156 (1952).
11. GANGULI, N.C.: Naturwiss. 40, 624 (1953).
12. GERRITSMA, K.W. u. J.C. FREDERIKS: Chem. Weekbl. 51, 197 (1955).
13. GRAU, R., R. HAMM u. A. BAUMANN: Fleischwirtschaft 5, 78 (1953).
14. GRAU, R., R. HAMM u. A. BAUMANN: Angew. Chem. 65, Nr. 9 (1953).
15. GRUNZE, H. u. E. THILO: Sitzgsber. dtsh. Akad. Landwirt-
schaftswiss. Berlin. Kl. Math. u. allgem. Naturwiss.
Nr. 5, 26 pp. (1953). Ref. Chem. Abstr. 48, 4300 f.
16. HANES, C.S. u. F.A. ISHERWOOD: Nature (London) 164, 1107 (1949).
17. KARL-KROUPA, E.: Analyt. Chem. 28, 1091 (1956).
18. KÖBERLEIN, W. u. H. MAIR-WALDBURG: Z. Lebensmittel-Unters. u.
-Forsch. 102, 231 (1955).
19. MORTIMER, D.C.: Canad. J. Chem. 30, 653 (1952).
20. NETHERTON, L.E., A.R. WREATH u. D.N. BERNHART: Analyt. Chem.
27, 860 (1955).
21. SANSON, B.: Angew. Chem. 65, 423 (1953).
22. SANSON, B. u. R. KLEMENT: Angew. Chem. 65, 422 (1953).
23. WADE, H.E. u. D.M. MORGAN: Nature (London) 171, 529 (1953).
24. WESTMAN, A.E.R., A.E. SCOTT u. J.T. PEDLEY: Chemistry in Can.
4, Nr. 10, 35 (189) (1952).

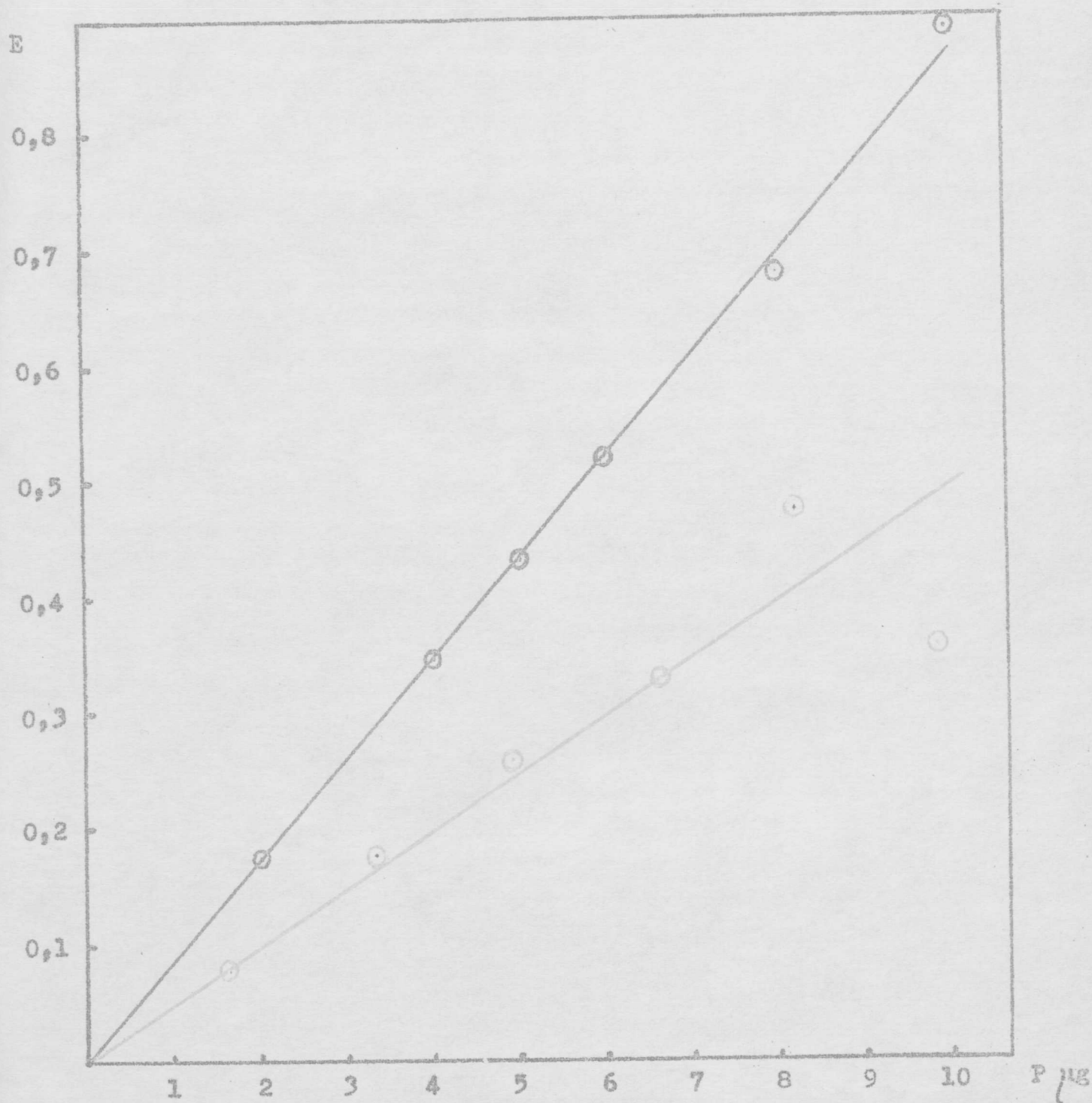


Abb. 1. Die Eichkurve des Di-Na-orthophosphats bei verschiedenen Reagenzkonzentrationen.

—	Ammoniummolybdat	5,0 g/100 ml
—	Hydrazinhydrochlorid	0,08 g/100 ml
—	Ammoniummolybdat	2,5 g/100 ml
—	Hydrazinhydrochlorid	0,19 g/100 ml

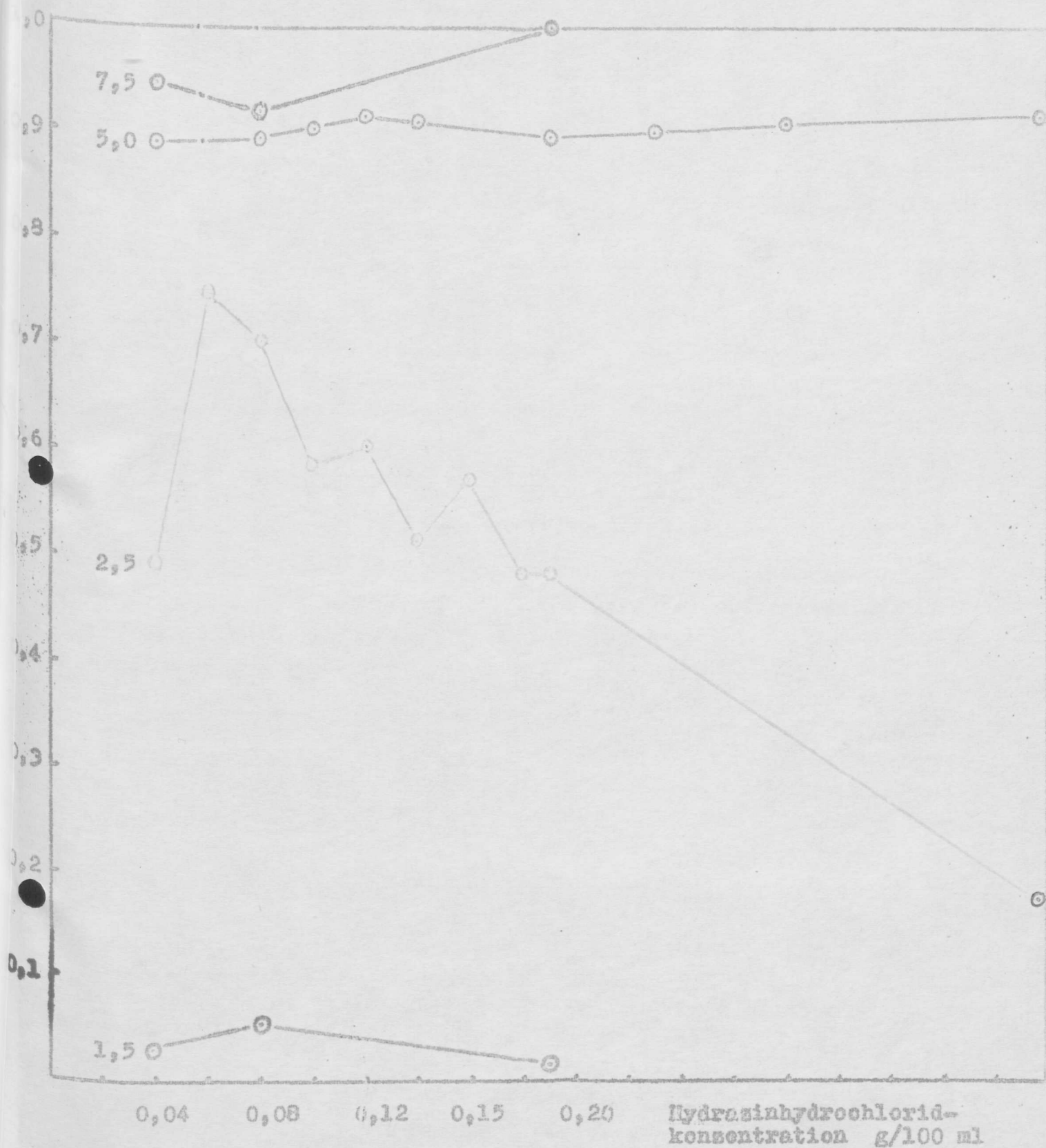


Abb. 2. Der Einfluss der Ammoniummolybdat- und Hydrazinhydrochloridkonzentrationen auf die Intensität der Farbe.

Ammoniummolybdatkonzentration	1,5 g/100 ml
" "	2,5 g/100 ml
" "	5,0 g/100 ml
" "	7,5 g/100 ml

Tabelle 3. Die quantitative Bestimmung des Di-Na-orthophosphats. Die kolorimetrische Messungen sind gegen die Papierkontrolle und den Mittelwert der Reagenzkontrolle ausgeführt worden.

Probe Nr	Wirkliche P-Menge δ^2	Papierkontrolle			Reagenzkontrolle (Mittelwert)		
		Gefundene P-Menge δ^2	Fehler %	Abs. Fehler δ^2	Gefundene P-Menge δ^2	Fehler %	Abs. Fehler δ^2
1	3,74	3,15	-15,7	-0,59	4,40	+14,9	+0,66
2	3,74	3,80	+ 1,6	+0,06	3,35	- 9,4	-0,39
3	3,74	4,15	+11,1	+0,41	3,30	-11,7	-0,44
4	3,74	3,10	-17,1	-0,64	4,12	+10,2	+0,37
5	3,74	3,01	-19,5	-0,73	3,10	-17,1	-0,64
6	3,74	3,76	+ 0,5	+0,02	2,96	-20,8	-0,78
7	3,74	3,35	-10,4	-0,39	3,55	- 5,1	-0,19
8	3,74	2,90	-22,4	-0,84	4,00	+ 6,4	+0,26
9	3,74	3,18	-15,0	-0,56	3,61	- 3,5	-0,13
10	3,74	3,36	-10,1	-0,38	3,52	- 6,0	-0,22
11	3,74	-	-	-	4,10	+ 9,9	+0,36
12	3,74	-	-	-	3,20	-14,4	-0,54
13	5,91	5,92	+ 0,1	+0,01	5,25	-11,0	-0,66
14	5,91	6,20	+ 5,0	+0,29	5,38	- 9,0	-0,53
15	5,91	5,35	- 9,3	-0,56	5,96	+ 0,8	+0,05
16	5,91	5,35	- 9,3	-0,56	5,12	-13,3	-0,79
17	5,91	5,35	- 9,3	-0,56	5,10	-12,3	-0,81
18	5,91	5,86	- 1,0	-0,05	5,20	-11,8	-0,71
19	5,91	5,15	-12,6	-0,56	5,34	- 9,3	-0,57
20	5,91	5,00	-15,2	-0,91	4,70	-20,3	-1,21
21	5,91	5,30	-10,0	-0,61	5,16	-12,5	-0,75
22	5,91	-	-	-	6,12	+ 3,0	+0,21
23	5,91	-	-	-	5,39	- 8,6	-0,52
24	5,91	-	-	-	5,25	-11,0	-0,66
25	5,91	-	-	-	5,53	- 6,3	-0,38
26	5,91	-	-	-	4,96	-16,0	-0,95
27	5,91	-	-	-	6,23	+ 5,0	+0,32
28	5,91	-	-	-	6,56	+11,1	+0,65
29	5,91	-	-	-	5,76	- 2,5	-0,15
30	5,91	-	-	-	5,76	- 2,5	-0,15

Tabelle 4. Die quantitative Bestimmung von Di-Na-orthophosphat und Tetra-Na-pyrophosphat. Die kolorimetrische Bestimmungen sind gegen Reagenzkontrollen ausgeführt worden.

Probe Nr	Wirkliche P-Menge %		Gefundene P-Menge %		Fehler%		Abs. Fehler%	
	Ortho-phosphat	Pyro-phosphat	Ortho-phosphat	Pyro-phosphat	Ortho	Pyro	Ortho	Pyro
1	3,74	4,0	3,32	3,97	-11,3	- 0,8	-0,42	-0,03
2	3,74	4,0	4,00	4,06	+ 6,9	+ 1,5	+0,26	+0,06
3	3,74	4,0	4,08	4,64	+ 9,1	+16,0	+0,34	+0,64
4	3,74	4,0	3,66	4,56	- 2,1	+14,0	-0,08	+0,56
5	3,74	4,0	3,94	4,00	+ 5,3	± 0	+0,20	±0
6	3,74	4,0	3,07	4,06	-18,0	+ 1,5	-0,67	+0,06
7	3,74	4,0	3,18	4,25	-15,0	+ 6,2	-0,56	+0,25
8	3,74	4,0	3,10	3,80	-17,1	- 5,2	-0,64	-0,20
9	3,74	4,0	3,47	3,77	- 7,2	- 5,7	-0,27	-0,23
10	3,74	4,0	3,64	3,99	- 2,7	- 0,3	-0,10	-0,01
11	3,74	4,0	3,25	4,25	-13,1	+ 6,2	-0,49	+0,25
12	3,74	4,0	3,70	3,84	- 1,1	- 4,0	-0,04	-0,16
13	3,74	4,0	3,32	4,12	-11,1	+ 3,0	-0,42	+0,12
14	3,74	4,0	3,52	3,90	- 5,9	- 2,5	-0,22	-0,10
15	3,74		3,45		- 7,8		-0,29	
16	3,74		4,20		+12,3		+0,46	
17	3,74		3,10		-17,1		-0,64	
18	3,74		3,27		-12,6		-0,47	
19	3,74		3,42		- 8,6		-0,32	
20	3,74		3,47		- 7,2		-0,27	
21	3,74		3,25		-13,1		-0,49	
22	3,74		3,90		+ 4,3		+0,16	
23	3,74		3,60		- 3,7		-0,14	
24	3,74		3,77		+ 0,8		+0,03	
25	3,74		3,25		-13,1		-0,49	
26	5,90		5,80		- 1,7		-0,10	
27	5,90		5,28		-10,5		-0,62	
28	5,90		5,56		- 5,8		-0,34	
29	5,90		5,39		- 8,6		-0,51	

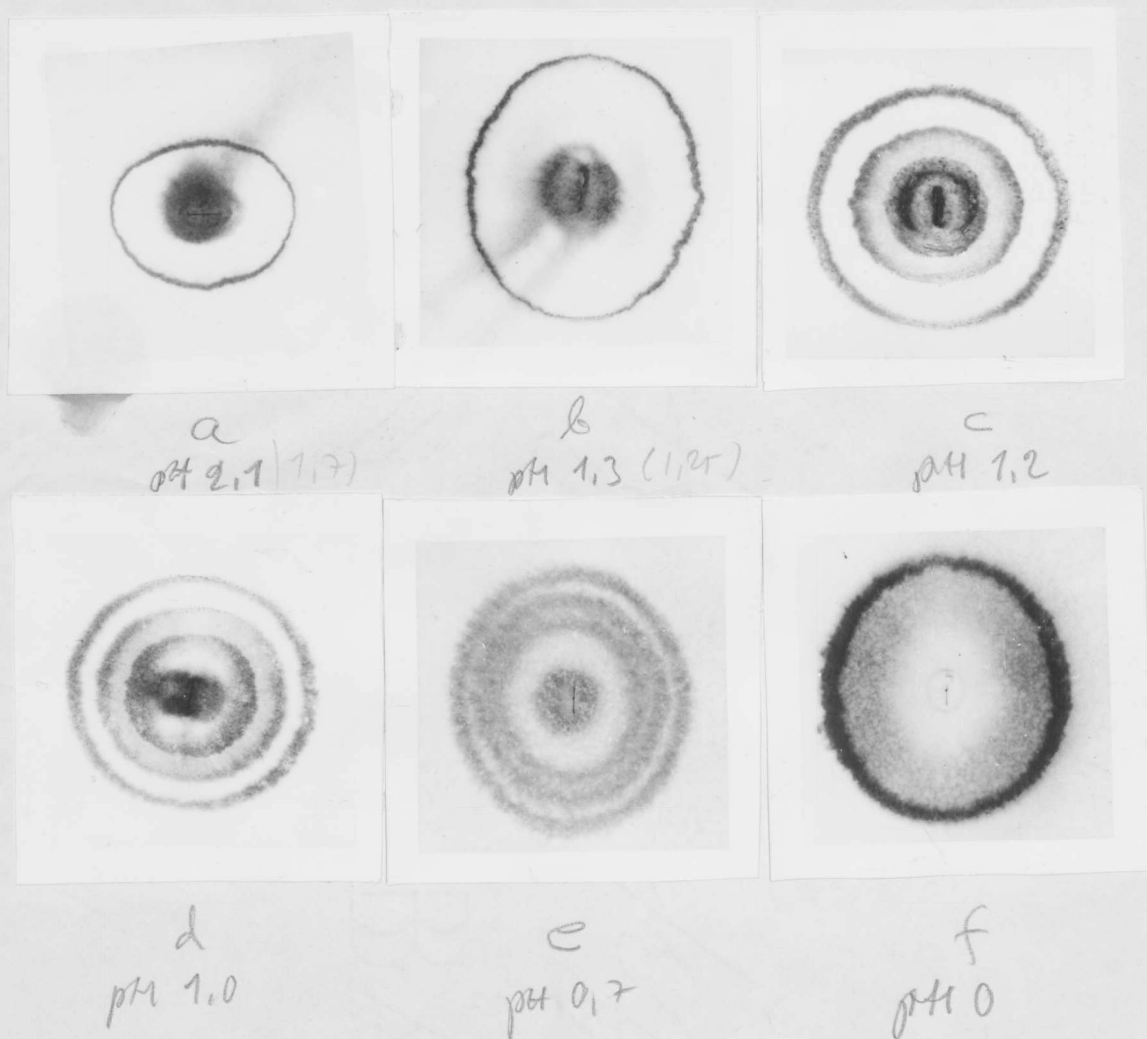


Abb. 3. Die Wirkung des Säuregrads des Fließmittels auf die Wanderung der Phosphate. Lauftemperatur 12°C.

pH 2,1	Fließmittel:	a = BuOH - H ₂ O - 1-n HCl (20:8,75:1,25)
pH 1,3		b = BuOH - H ₂ O - 1-n HCl (20:7,50:2,50)
pH 1,2		c = BuOH - H ₂ O - 1-n HCl (20:5:5)
pH 1,0		d = BuOH - 1-n HCl (2:1)
" 0,7		e = BuOH - 2-n HCl (2:1)
" 0		f = BuOH - konz. HCl (2:1)

Ordnung der Phosphatzonen dieselbe wie im Bild 1.

Wie aus Abb.2 ersichtlich, ist die Wanderung der Phosphate auf dem Papier von der pH-Wert des Fliessmittels abhängig. In diesem zwei Chromatogramme liegt der pH-Wert im Bereich 1,3-1,7. Nur das Orthophosphat wandert, dagegen bleiben die anderen im Zentrum. Der pH-Wert in diesem Chromatogramm liegt bei 1,2 und das Tripolyphosphat wird dabei noch teilweise von dem Heksametaphosphat überlagert. Das beste Resultat bekommt man bei Lösungsmittel, deren pH-Wert von 1,0 ist. Wenn der pH-Wert zu niedrig liegt, erleiden die Phosphate Hydrolyse. Diese tritt umso mehr in Erscheinung je grösser der Säuregehalt des Fliessmittels ist. Dies zeigt das letzte Chromatogramm.

Das Extrahieren

Das quantitative Extrahieren der Phosphate aus der Wurst ist sehr schwierig. Massnahme. Wir haben versucht, die Extraktlösung auf solche Weise zu herstellen, dass zu den Wurstbrät feste Trichloressigsäure zugefügt werden, die Eiweissstoffe koaguliert und dadurch auch das Wasserbindungsvermögen der Wurst in Minimum liegt. Aber wie gross und wie fest ist die Bindung der Phosphate mit den Eiweissstoffen des Fleisches, das haben wir noch nicht untersucht. Verhindert diese Bindung dann die Löslichkeit der Phosphate ins Fleissswasser, dass wissen wir auch noch nicht.