

Phosphorsäurebestimmung in Lebensmitteln mit Hilfe des Stufenphotometers nach Pulfrich

Autor(en): **Wuhrmann, Hans / Högl, Otto**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène**

Band (Jahr): **35 (1944)**

Heft 5

PDF erstellt am: **12.07.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-983555>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

PHOSPHORSÄUREBESTIMMUNG IN LEBENSMITTELN MIT HILFE DES STUFENPHOTOMETERS NACH PULFRICH

Von *Hans Wuhrmann* und *Otto Högl*, Bern
(Aus dem Laboratorium des Eidg. Gesundheitsamtes)

I. Allgemeines

Dem Element Phosphor kommt in der Chemie der Lebensmittel eine hervorragende Bedeutung zu. Die dieses Element führenden Verbindungen, meist veresterte Phosphorsäure enthaltend, nehmen durch ihre Eigenart und besondere Reaktionsfähigkeit eine Schlüsselstellung bei vielen Stoffwechselfvorgängen ein.

Wir nennen die Nucleoproteide, welchen in den Zellkernen als Chromosomen wesentlichste Bedeutung bei der Vererbung und Zellteilung und damit beim Wachstum des Organismus zukommt, die Phosphorproteide, deren wichtigster Vertreter, das Casein, den Hauptanteil der stickstoffhaltigen Baustoffe des jungen Tieres darstellt. In den Fetten, speziell in denjenigen für Leben und Vermehrung besonders wichtiger Körperteile, wie Gehirn, Mark, Sperma, Eisubstanz, treten die Lecithine, Kephaline, Sphingomyeline auf, Verbindungen von Glycerin, Fettsäuren, Phosphorsäure und Aminoalkoholen, die wichtigsten Funktionen zu dienen haben. In den Keimgeweben der Pflanzen findet sich schliesslich das Phytin, Inosithexaphosphat vor, ein Körper, dessen Bedeutung noch nicht genau bekannt, aber gewiss von Wichtigkeit ist.

Die ausserordentliche Veränderlichkeit der hier — keineswegs erschöpfend — aufgezählten Verbindungen befähigt sie, in zahlreichen Stoffwechselfvorgängen sozusagen als Katalysatoren, Vermittler, aufzutreten. Ein gewisser Phosphatgehalt ist entsprechend bei vielen fermentativen Vorgängen unbedingt erforderlich. Wir nennen die Atmungsvorgänge in der Zelle, die verschiedenen Arten der Gärungen usw. Da solche Umsetzungen für die Erhaltung des Lebens der

meisten Lebewesen von grösster Bedeutung sind, zeigen entsprechend auch die natürlichen, fabrikatorisch wenig veränderten Lebensmittel als biogene Substanzen vielfach einen ziemlich konstanten, manchmal charakteristischen Phosphorgehalt.

Die leichte Spaltbarkeit der hier erwähnten organischen Phosphorverbindungen bringt es andererseits mit sich, dass Verderbnis von Lebensmitteln, d. h. Zersetzungs Vorgänge wiederum enzymatischer oder bakteriell-fermentativer Art, meist mit einer starken Veränderung dieser Verbindungen einhergehen. Grössere, Phosphor enthaltende Komplexe werden in kleinere, einfachere Anteile aufgespalten.

So wie der Phosphorgehalt als Ganzes oder in besonderer Bindungsform unter Umständen eine charakteristische Zahl für ein bestimmtes Lebensmittel liefern kann, so kann die Feststellung der relativen Bindungsverhältnisse Auskunft über den Zustand des Lebensmittels, dessen Frische oder fortschreitende Verderbnis geben.

Den Bestimmungsmöglichkeiten des Phosphors in Lebensmitteln kommt daher in recht verschiedener Hinsicht grösstes Interesse zu. Von Bedeutung ist dabei weiter, wie genau, wie rasch und in welcher Menge des Lebensmittels der Phosphorgehalt noch bestimmbar ist. Da die Phosphorbestimmung stets eine Mineralisierung, eine nasse oder trockene Verbrennung der organischen Substanz voraussetzt, wird die Bestimmung kleiner Mengen insofern von Interesse sein, als hierbei die Mineralisierung viel rascher und leichter gelingt als bei grösseren Quantitäten.

Unsere Studien über die Verderbnis von Mahlprodukten¹⁾ und Eierkonserven hatten uns die Wichtigkeit der Phosphorbestimmung erkennen lassen. Wir gingen daher daran, die Phosphorsäurebestimmungsmethoden einer kritischen Überprüfung zu unterziehen.

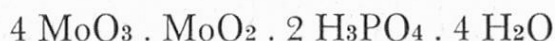
II. Auswahl der Methode

Die klassische Methode der Fällung als Ammonium-Phosphor-Molybdat (nach Woy und von Lorenz) ermöglicht die Bestimmung recht kleiner Mengen. Immerhin ist in einzelnen Lebensmitteln mit sehr geringen Mengen zu rechnen. Wir nennen z. B. die sog. «Tafelgetränke mit Fruchtsaft», die gemäss eidg. LMV. nicht mehr als 4 % Fruchtsaft enthalten müssen. Der ohnehin nicht sehr hohe Phosphatgehalt des reinen Fruchtsaftes erfährt eine nochmals 25 fache Verdünnung, so dass hier wirklich kleine Mengen zur Bestimmung gelangen. Ähnliches ist zu sagen vom Phosphatgehalt von Mehlauszügen, von Honig und vielen andern Produkten.

Schon vor Jahren hat der eine von uns²⁾ darauf hingewiesen, dass die Mo-Blau-Reaktion nach Zinzadze³⁾ sich sehr gut für die Bestimmung kleiner Phosphorsäuremengen eigne. In Ermangelung eines Photometers konnte jedoch damals keine grosse Genauigkeit erzielt werden.

Ein ganz ähnlicher Vorschlag wurde einige Jahre später von *Mohler, Hämmerle* und *Hartnagel*⁴⁾ für die Bestimmung des Phosphatgehaltes in Tafelgetränken publiziert.

Bei der Aufnahme unserer neuerlichen Arbeiten in dieser Richtung versuchten wir nun, die Molybdänblaumethode in ihren verschiedenen Modifikationen kennen zu lernen. Ein Stufenphotometer nach *Pulfrich* stand nunmehr zur Verfügung, so dass die colorimetrischen Bestimmungen mit aller wünschbaren Genauigkeit durchgeführt werden konnten. Nach reiflicher Prüfung fiel unsere Wahl auf die Methode *Fiske-Subbarow*⁵⁾, in der Modifikation von *Theorell*⁶⁾. Auch hier wird eine Blaufärbung in saurer Lösung erzeugt. Im Gegensatz zum Verfahren nach *Zinzadze* ist jedoch eine Entwicklung durch Reduktion notwendig. Die in saurer Lösung entstehende Phosphormolybdänsäure wird durch ein organisches Reduktionsmittel in den Molybdänblau-Komplex (*Tschopp*⁷⁾)



übergeführt.

Als besondere Vorteile dieser Methode sind hervorzuheben die gute Genauigkeit selbst bei sehr kleinen Mengen Phosphat und entsprechend die Möglichkeit, mit sehr geringen Mengen Substanz auszukommen. Wir versuchten, die unterste Grenze einer exakten Bestimmbarkeit zu erfassen, wobei es uns gelang, gegenüber den bisherigen Publikationen nochmals um etwa eine Zehnerpotenz tiefer zu gelangen, wie weiterhin gezeigt werden soll.

Es ist hier eventuell am Platze, sich kurz über die Anwendbarkeit solcher photometrischer Methoden zu äussern. Es ist uns bekannt, dass eine Reihe amtlicher Laboratorien in der Schweiz bereits mit Erfolg sich des Stufenphotometers bedient. Andernorts fehlt dieses nützliche Instrument noch, doch sind die Vorteile desselben so gross, dass es sich unseres Erachtens empfiehlt, das Gerät wo immer möglich anzuschaffen. Alle Vorteile der colorimetrischen Methoden, deren Spezifität, Erfassbarkeit sehr geringer Mengen und damit Raschheit der Bestimmung, die ausserordentlich vielseitigen Möglichkeiten werden bei Besitz eines solchen Gerätes ergänzt durch die Genauigkeit, mit welcher hier die Messung erfolgen kann.

Am Beispiel der Molybdänblaumethode erläutert, kann in allen Fällen, wo homogene Substanzen vorliegen, d. h. vor allem bei klaren Flüssigkeiten, anstelle von bisher 20—50 cc, von 1—2 cc ausgegangen werden, wobei natürlich eine exakte Abmessung notwendig ist. Die nasse Verbrennung mit wenig Schwefel- und Salpetersäure ist rasch beendet. Dem Prinzip der Methode folgend, kann nun im gleichen Glase die Ammoniummolybdatlösung zugegeben werden, worauf mit einem organischen Reduktionsmittel die Molybdänblaufärbung entwickelt wird. Alle diese Operationen nehmen in der Regel nicht mehr als ca. 30 Minuten in Anspruch. Es folgt nun die Messung der Farbintensität, die insbesondere bei Serien ein sehr rasches Arbeiten gestattet. Verglichen mit der klassischen Methode, die eine langdauernde Verbrennung, Fällung, Filtration und Wägung

notwendig macht, lassen sich ganz bedeutende Zeiteinsparungen erreichen. Dasselbe gilt bezüglich Materialaufwand, was speziell in der heutigen Zeit mit knapper Molybdänversorgung ins Gewicht fällt.

Damit kann eine Anwendung der Methode in Fällen ins Auge gefasst werden, wo bisher der Aufwand an Zeit und Material eine Bestimmung verhinderte.

III. Eigene Untersuchungen

Obwohl bereits mehrfach über die besprochene Methode in der Literatur berichtet wurde, sahen wir uns dennoch veranlasst, in verschiedener Richtung Überprüfungen vorzunehmen. Die Literaturangaben sind nicht in allen Punkten exakt. Ferner wurde nicht mit den gleichen Objekten gearbeitet, mit denen wir es vorwiegend zu tun haben. Ausserdem sind die Angaben zerstreut und beziehen sich nicht auf die gleichen Voraussetzungen. So schien uns eine kritische Sichtung notwendig, wobei möglichst viele Bedingungen unter den für uns massgebenden Verhältnissen berücksichtigt wurden.

Wir haben in der Folge versucht, den Einfluss der einzelnen Faktoren einzeln festzustellen und daraus die massgebende Arbeitsweise abzuleiten.

a) *Benötigte Menge Ausgangsmaterial*: Fiske und Subbarow haben die colorimetrische Phosphatbestimmungsmethode für biologisches Material, vor allem für Körperflüssigkeiten ausgearbeitet. Bei der Übertragung der Modifikation *Theorells* auf Lebensmittel wird man daher zweckmässig an flüssige Lebensmittel wie Wein, Süsswein, Fruchtsäfte, Limonaden, Milch und andere denken; denn gerade hier kann der Vorteil der colorimetrischen Methode gegenüber derjenigen von *Lorenz* voll ausgenutzt werden. Da die flüssigen Materialien ihrer grösseren Homogenität wegen die Verwendung einer wesentlich kleineren Ausgangsmenge gestatten, lässt sich die der Bestimmung vorangehende Mineralisierung in kürzester Zeit durchführen. Für Süssmost haben wir 0,2 cc Material mit 0,55 cc H_2SO_4 1+3 und wenig konz. HNO_3 versetzt und ohne Schwierigkeiten innert 10 Minuten über der Sparflamme eines normalen Bunsenbrenners verbrannt. Für Milch oder ähnliche, phosphorreiche Produkte benötigte man nur den 4ten Teil dieser Menge, also 0,05 cc! Bei Limonaden, deren Fruchtsaftgehalt auf mindestens 4 % festgesetzt ist, kann man mit 5 cc auskommen.

Normalerweise wird man aber nicht solch kleine Mengen verwenden. Am besten stellt man von der zu untersuchenden Flüssigkeit in einem 10- oder 25 cc-Messkölbchen eine Verdünnung her, von der 1 cc verbrannt wird. Von Limonaden verwendet man 5 cc unverdünnte Substanz, von phosphorreichen Produkten entsprechend grössere Verdünnungen.

Bei Anwendung der Methode auf feste Lebensmittel kann die Ausgangsmenge nicht beliebig verringert werden. Soll das Resultat dem wirklichen mittleren Phosphatgehalt möglichst nahe kommen, so muss auch die zur Analyse verwendete Substanz ein gewisses Minimalgewicht aufweisen, welches mit zu-

nehmender Homogenität sinkt. Unter 1 g wird man hier nicht gehen können. Bei der Mineralisierung kann man damit nicht viel Zeit einsparen, wohl aber mit der Bestimmung selbst. Liegt die kalte, klare Lösung vor, so benötigt man zur Entwicklung der Blaufärbung und zur Messung etwa 20—25 Minuten, wobei man leicht 2 Doppelbestimmungen nebeneinander ausführen kann.

b) Versuche an Modellösungen: Wir haben zunächst Vergleichsbestimmungen an Lösungen ausgeführt, die einerseits nur Phosphat, andererseits Phosphat und Zucker enthielten. Der Zweck war, die Genauigkeit der gravimetrischen mit der photometrischen Methode zu vergleichen. Der Zuckerzusatz erfolgte, um die Wirkung der Veraschung, vor allem eine allfällige Reduktionswirkung bei der Verkohlung zu verfolgen.

Wir verwendeten KH_2PO_4 «Merk», welches zuerst bei 105°C 30 Minuten getrocknet wurde. In der folgenden Tabelle sind die mit reinen Phosphatlösungen gravimetrisch und colorimetrisch bestimmten Werte zusammengestellt. Versuch 1 wurde genau nach dem Schweizerischen Lebensmittelbuch (4. Aufl. S. 132) ausgeführt, die Versuche 2 und 3 nur mit 25 cc Flüssigkeit und 25 cc Lorenzreagenz. Da zwischen den gravimetrischen Bestimmungen mit der vollen und der halben Menge keine wesentlichen Unterschiede gefunden wurden, sind alle im nachfolgenden mit «gravimetrisch» bezeichneten Bestimmungen aus Sparsamkeit mit der halben Menge, also 25 cc ausgeführt worden.

Tabelle 1

Nr.	G od. C	Vorgelegt	Gefunden	Differenz	M
1	G	11,44 mg / 50 cc	11,38 mg	0,06 mg = 0,53 %	50 cc
2	G	11,44 mg / 25 cc	11,43 mg	0,01 mg = 0,09 %	25 cc
3	G	1,14 mg / 25 cc	1,11 mg	0,03 mg = 2,6 %	25 cc
4	C	28,62 mg / Lt	28,80 mg / Lt	0,18 mg = 0,63 %	1—4 cc

C = colorimetrische Bestimmung

G = gravimetrische Bestimmung

M = die zur Bestimmung verwendete Menge

In einer zweiten Versuchsreihe wurden Phosphatlösungen mit 8 % Saccharose versetzt und vor der Bestimmung trocken oder nass verbrannt. Die erhaltenen Werte sind in Tabelle 2 wiedergegeben:

Tabelle 2

Nr.	G od. C	Vorgelegt	Gefunden	Differenz	V
1	G	14,31 mg P ₂ O ₅	13,96 mg P ₂ O ₅	- 2,5 0/0	trocken
2	G	14,31 mg P ₂ O ₅	14,62 mg P ₂ O ₅	+ 2,2 0/0	trocken
3	G	14,31 mg P ₂ O ₅	14,15 mg P ₂ O ₅	- 1,1 0/0	trocken
4	G	14,31 mg P ₂ O ₅	8,62 mg P ₂ O ₅	- 40 0/0	trocken
5	C	1,43 ₁ mg P ₂ O ₅	1,38 mg P ₂ O ₅	- 3,5 0/0	trocken
6	C	1,43 ₁ mg P ₂ O ₅	1,48 mg P ₂ O ₅	+ 3,4 0/0	trocken
7	C	1,43 ₁ mg P ₂ O ₅	1,42 mg P ₂ O ₅	- 0,8 0/0	trocken
8	C	1,43 ₁ mg P ₂ O ₅	1,39 mg P ₂ O ₅	- 2,9 0/0	nass

V = Art der Verbrennung

G = gravimetrische Bestimmung

C = colorimetrische Bestimmung

Die Werte Nr. 5—8 zeigen, dass die photometrische Methode zur Phosphatbestimmung durchaus brauchbar ist. Die Schwankungen sind um etwa 10/0 grösser als bei der gravimetrischen Methode (Nr. 1—3). Dem Wesen der photometrischen Methode folgend, wurde bei dieser jeweiligen nur 1/10 der Menge von Nr. 1—3 verwendet, was aber auf die Genauigkeit kaum von Einfluss ist.

Bei der als Nr. 4 bezeichneten Probe (gravimetrische Methode) wurde bei der Verbrennung kräftig geglüht, was beträchtliche Verluste an Phosphor mit sich brachte. Es ist daher in dieser Hinsicht Vorsicht am Platze (siehe nächster Abschnitt).

c) Mineralisierung der organischen Substanz: Über die Verbrennung soll hier ebenfalls kurz berichtet werden. Wie schon erwähnt, zeigt Versuch Nr. 4 in Tabelle 2, dass man bei unsachgemässer Behandlung unter Umständen völlig falsche Werte erhalten kann. Richtige Zahlen wurden bei folgender Arbeitsweise gefunden: Von den Modellösungen wurden 25 cc mit 1 cc n/1 Calciumacetatlösung in einer Platinschale zur Trockne eingedampft und über einer schwachen, farblosen Bunsenflamme verbrannt. Sobald keine Glimmerscheinungen mehr sichtbar waren, wurden die Schalen vom Feuer genommen und nach Erkalten mit wenig Wasser befeuchtet. Durch vorsichtiges Kippen der Schalen kann man erreichen, dass die ausgelaugte Kohle auf die eine, der mehr oder weniger klare wässrige Auszug auf die andere Seite zu liegen kommt. In dieser Stellung verdampft man wieder auf dem Wasserbad zur Trockne und verbrennt wie oben. Meist genügt ein zweimaliger Auszug, um eine weisse Asche zu erhalten. Durch diese Behandlung vermeidet man das Schmelzen der Asche, was namentlich bei phosphatreichen Produkten sehr leicht eintritt und dann infolge Einschluss von Kohleteilchen auch bei Erhitzen bis zur hellen Rotglut keine hellgraue bis weisse

Asche mehr liefert. Abgesehen von der unvollständigen Verbrennung treten offenbar nach Versuch 4 in Tabelle 2 Verluste durch Verflüchtigung oder Reduktion ein. Zur trockenen Verbrennung sollte man daher so niedrig wie möglich erhitzen.

Zur nassen Verbrennung wurden 1, 2 oder mehr cc Lösung mit 0,55 oder 1,1 cc H_2SO_4 1+3 in einem *Jenaer* Reagenzglas (150×15) versetzt und über freier Flamme mit nach und nach 2 — 3 cc konz. HNO_3 erhitzt, bis keine Verkohlung mehr auftrat. Schliesslich wurde bis zum Auftreten weisser SO_3 -Dämpfe abgeraucht. Das Reagenzglas wurde hierauf abgekühlt, mit wenig Wasser versetzt (zur Zersetzung der gebildeten Nitrosylschwefelsäure) und nochmals kurz abgeraucht. Nach erfolgter Abkühlung ist die Probe zur colorimetrischen Bestimmung fertig. Die Entwicklung der Molybdänblaufarbe kann nun im gleichen Glase erfolgen, was eben nur bei Anwendung kleiner Substanzmengen möglich ist. Man vermeidet das Abpipettieren aliquoter Teile oder ein quantitatives Überführen in grössere Gefässe und damit auch eine häufige Fehlerquelle.

d) *Vorbereitung zur Photometrie*: Die nunmehr vorliegende klare, schwefelsaure Lösung wird nun zur colorimetrischen Bestimmung vorbereitet. Geht man von der trockenen Verbrennung aus, so wird die Asche mit H_2SO_4 1+3 versetzt, auf bestimmtes Volumen aufgefüllt und filtriert.

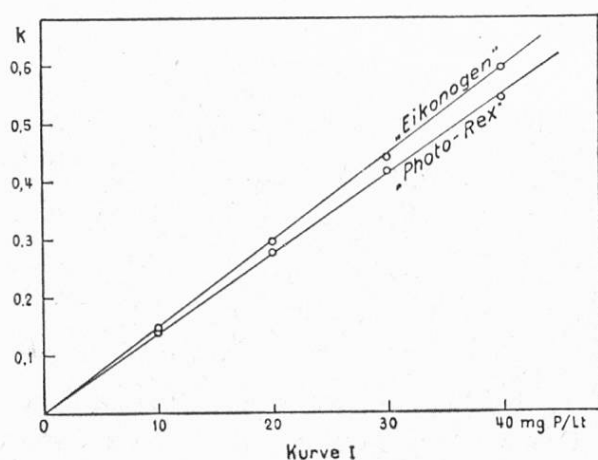
Zur Colorimetrie sollte immer auf gleiches Volumen aufgefüllt werden. Dieses Totalvolumen ist von *Theorell* auf 26,5 cc fixiert worden. Wir haben es für unsere Zwecke auf 10 cc verringert, weil dadurch sowohl die Genauigkeit der Bestimmung erhöht, als auch die nötige Menge des heute schwer erhältlichen Ammoniummolybdates herabgesetzt wurde.

Bei der nassen Verbrennung fallen bei Verwendung von 1 cc Lösung und 0,55 cc H_2SO_4 1+3 erfahrungsgemäss etwa 0,2 cc Flüssigkeit an. Diese werden nun unter Verwendung von Stabpipetten mit 1 cc 5%iger Ammoniummolybdatlösung versetzt, mit 8,3 cc Wasser auf 9,5 cc Flüssigkeit gebracht und hierauf 0,5 cc Reduktionsreagenz zugegeben. Damit beträgt das Totalvolumen genau 10 cc. Die zur Absolutcolorimetrie nötige Blindprobe bereitet man aus 8 cc Wasser, 1 cc Ammoniummolybdat, 0,5 cc H_2SO_4 1+3 und 0,5 cc Reduktionsreagenz, wie in Tabelle 4 angegeben. Durch Versuche konnten wir feststellen, dass sich eine Verbrennung der Blindprobe erübrigt.

e) *Reduktion der Phosphat-Molybdat-Lösung zu Molybdänblau*: Das verwendete Reduktionsreagenz ist nach *Theorell* zusammengesetzt aus 0,5 g trockener 1,2,4-Aminonaphtholsulfonsäure, 195 cc 15%iger Natriumbisulfidlösung und, je nach der zur völligen Lösung nötigen Menge (5—30 cc) 20%iger Natriumsulfidlösung. Es soll nicht älter sein als 2—3 Wochen.

*E. und E. Tschopp*⁷⁾ haben über die zur Reduktion des Phosphorammoniummolybdates brauchbaren organischen Substanzen berichtet. Sie stellten fest, dass von den in Frage kommenden organischen «Entwicklersubstanzen» die von *Fiske-Subbarow* angegebene 1,2,4-Aminonaphtholsulfonsäure und das p-Methylamino-

phenolsulfat sich am besten bewährten. Beide sind in ihrer Reduktionswirkung von der Acidität der Lösung weitgehend unabhängig, und sogar relativ hohe Salzkonzentrationen stören die Bildung von Molybdänblau nicht. Die erste war bis vor 5 oder 6 Jahren unter dem Namen «Eikonogen-Agfa» im Handel, die zweite ist unter dem Namen «Photo-Rex» bekannt. Die Aminonaphtolsulfonsäure stellten wir uns nach der von *O. Folin*⁸⁾ sehr genau angegebenen Vorschrift selbst her und verwendeten ausschliesslich dieses Reduktionsmittel für unsere Versuche. Das im Handel erhältliche «Photo-Rex» verhält sich aber sowohl nach den Angaben *Tschopp*s als auch nach unseren Versuchen sehr ähnlich. Als Beispiel führen wir eine Eichkurve an, welche wir mit diesen beiden «Entwicklern» und reiner KH_2PO_4 -Lösung aufstellten.



Die mittels «Photo-Rex» erhaltene Kurve zeigt einen weniger steilen Anstieg als die «Eikonogen»-Kurve. Der Extinktionsverlauf ist jedoch in beiden Fällen linear, das *Beer*'sche Gesetz also erfüllt. Es sei hier noch angefügt, dass die Redoxlösungen anstatt mit NaHSO_3 auch mit Kaliummetabisulfit hergestellt werden können, ohne dass Veränderungen eintreten. Das Kaliummetabisulfit hat den Vorteil, dass die Lösungen klarer werden.

Wie schon oben erwähnt, ist die Intensität der so erhaltenen Molybdänblaufärbungen nach *Tschopp* in weiten Grenzen von der Acidität der Lösung unabhängig. Um ganz sicher zu sein (bei der nassen Verbrennung bleiben, je nach Erhitzungsgrad, wechselnde Mengen H_2SO_4 zurück!), haben wir einen Versuch mit vier verschiedenen H_2SO_4 -Konzentrationen durchgeführt und das Resultat in Tabelle 3 wiedergegeben.

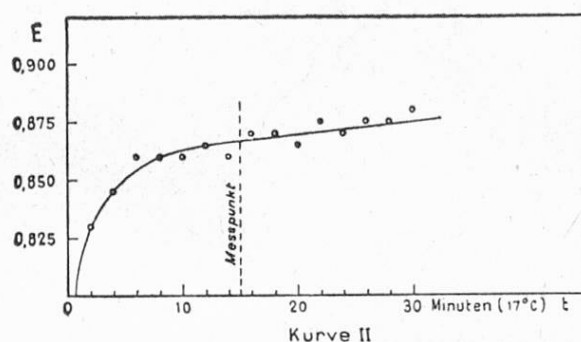
Tabelle 3

cc H_2SO_4 1 + 3	cc H_2O	k
0,25	8,25	0,430
0,50	8,00	0,425
0,75	7,75	0,4275
1,00	7,50	0,4275

Die k -Werte, das ist die auf die Cuvettenschichtdicke = 1 cm reduzierte Extinktion, werden also auch bei einer doppelt so grossen H_2SO_4 -Konzentration, wie sie bei der Messung reiner Phosphatlösungen verwendet wurde, nicht wesentlich verändert.

Bei der quantitativen Auswertung der mit organischen Reduktionsmitteln hergestellten Molybdänblaufärbung sind 2 Faktoren zu beachten:

1. die Abhängigkeit der Farbintensität von der Reaktionszeit, und
 2. die Temperaturabhängigkeit dieser Farbreaktion.
1. Die Farbintensität ist nicht konstant, sondern nimmt mit der Zeit zu. Die Kurve 2 veranschaulicht den Anstieg der Extinktion mit der Zeit.



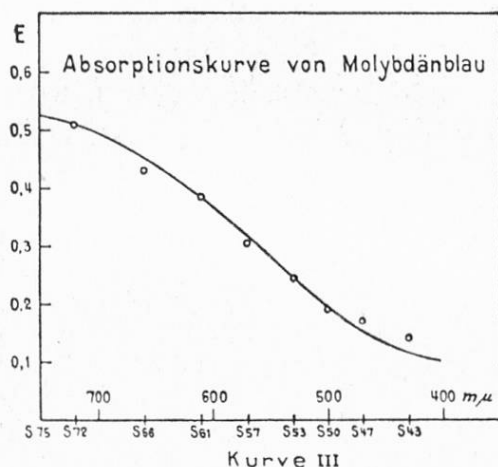
Die Angabe *Theorells* (l. c.), wonach das Maximum der Intensität bereits nach 6 Minuten erreicht ist, trifft mehr oder weniger zu. Immerhin mussten wir feststellen, dass, wie aus Kurve 2 hervorgeht, die Farbtiefe langsam weiter zunimmt.

Um reproduzierbare Werte zu erhalten, gingen wir so vor, dass wir die mit Redox-Reagenz versetzten Lösungen sofort durch Umschütten in ein zweites Reagenzglas mischten und in ein Wasserbad von 20 ° C einsetzten. Die Reagenzgläser wurden nach 12—14 Minuten aus dem Bad herausgenommen und nach genau 15 Minuten gemessen. Wie die Eichkurve (Kurve 4) zeigt, liefern die auf diese Weise mit reinen Phosphatlösungen hergestellten Färbungen einen bis 50 γ P geradlinigen Extinktionsverlauf.

2. Bei diesem Vorgehen schaltet man gleichzeitig den zweiten Faktor, die Temperaturabhängigkeit aus. Mit steigender Temperatur verschiebt sich die Kurve 2 nicht unwesentlich gegen die Ordinatenachse, so dass nach 15 Minuten ein höherer Wert gefunden wird. Bei einer Farbentwicklung bei 27 ° C haben wir in dem wiedergegebenen Bereich nach 15 Minuten eine Extinktionsdifferenz von 0,5 Einheiten gefunden. Aus diesem Grunde empfiehlt es sich, die Temperatur von 20 ° C \pm 1 ° C einzuhalten.

f) *Das Aufstellen der Eichkurve* : Das Maximum der Lichtabsorption von Molybdänblau liegt offenbar im Ultra-Rot, hart an der Grenze des sichtbaren Gebietes. Wir haben den Verlauf der Absorption in Abhängigkeit von der

Wellenlänge der Filterschwerpunkte in Kurve 3 wiedergegeben. Zur Messung werden daher am besten die beiden im Gebiet des Absorptionsmaximums gelegenen Filter S 72 oder S 75 verwendet. Diese beiden Filter zeigen nur kleine Farbdifferenzen in beiden Gesichtshälften. (Diese Farbdifferenzen treten immer dann auf, wenn man Filter zur Messung benutzt, in deren Spektralbereich die Absorption stark ab- oder zunimmt.)



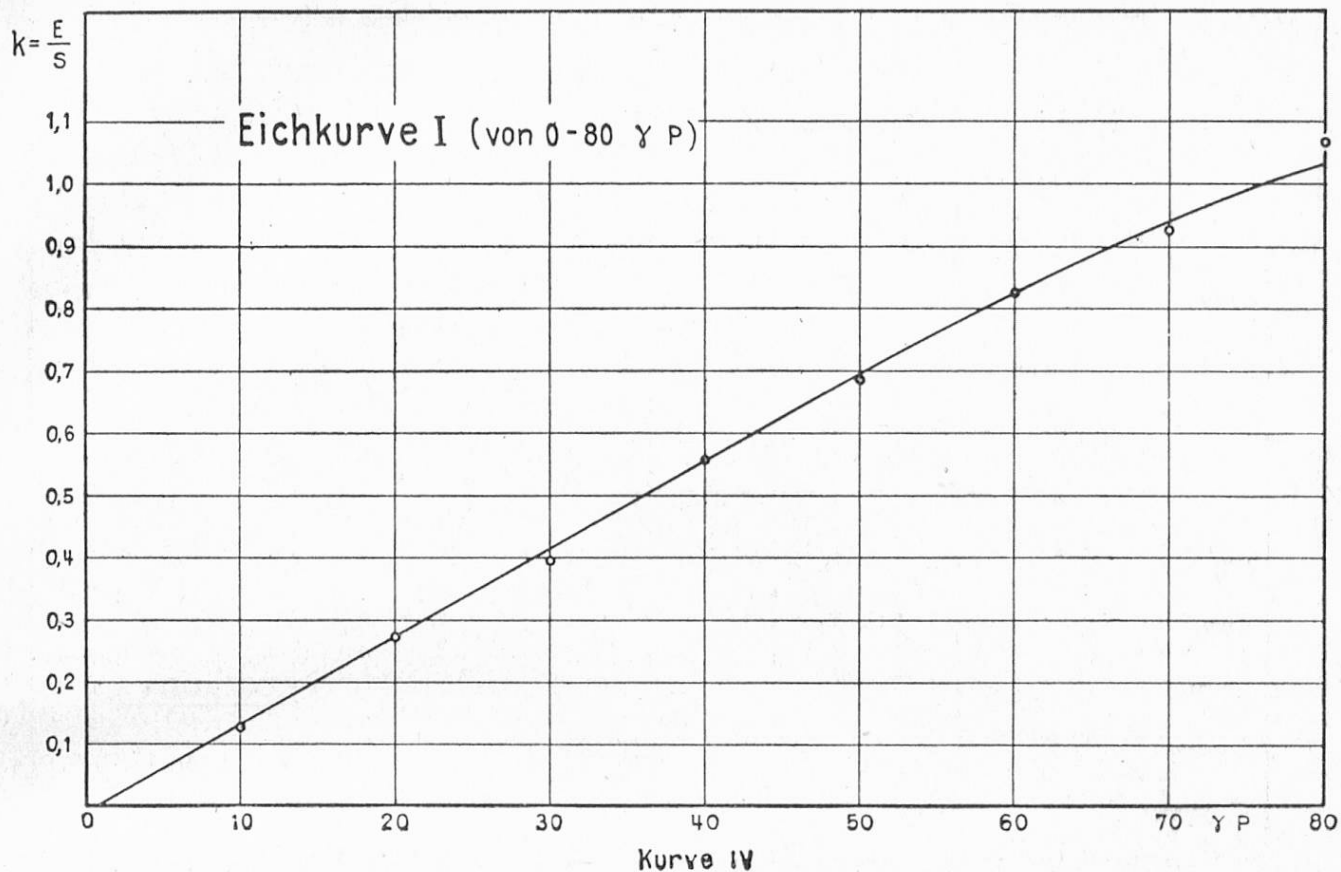
Zur Aufstellung der Eichkurve verwendeten wir Lösungen von KH_2PO_4 «Merk». Das Salz wurde zuvor bei 105°C 30 Minuten getrocknet. 0,4388 g wurden im Liter gelöst und 50 cc der so erhaltenen Lösung auf 500 cc gebracht (Lösung I). 1 cc dieser Lösung I enthielt somit $10 \gamma \text{ P/cc}$ oder 10 mg P/Lt . Nach dem in Tabelle 4 angeführten Schema wurde die Eichkurve (Kurve 4) aufgestellt.

Tabelle 4

cc Lösung I	cc H_2SO_4	cc Molybd. Lsg.	cc H_2O	cc Redox. R	S	E	k
1	0,5	1	7	0,5	2	0,2526	0,1263
2	0,5	1	6	0,5	2	0,544	0,272
3	0,5	1	5	0,5	2	0,790	0,395
4	0,5	1	4	0,5	2	1,114	0,557
5	0,5	1	3	0,5	2	1,370	0,685
6	0,5	1	2	0,5	1	0,825	0,825
7	0,5	1	1	0,5	1	0,925	0,925
8	0,5	1	0	0,5	1	1,066	1,066
—	0,5	1	8	0,5			

S = Schichtdicke der Cuvetten in cm
 E = Extinktion
 k = E/S

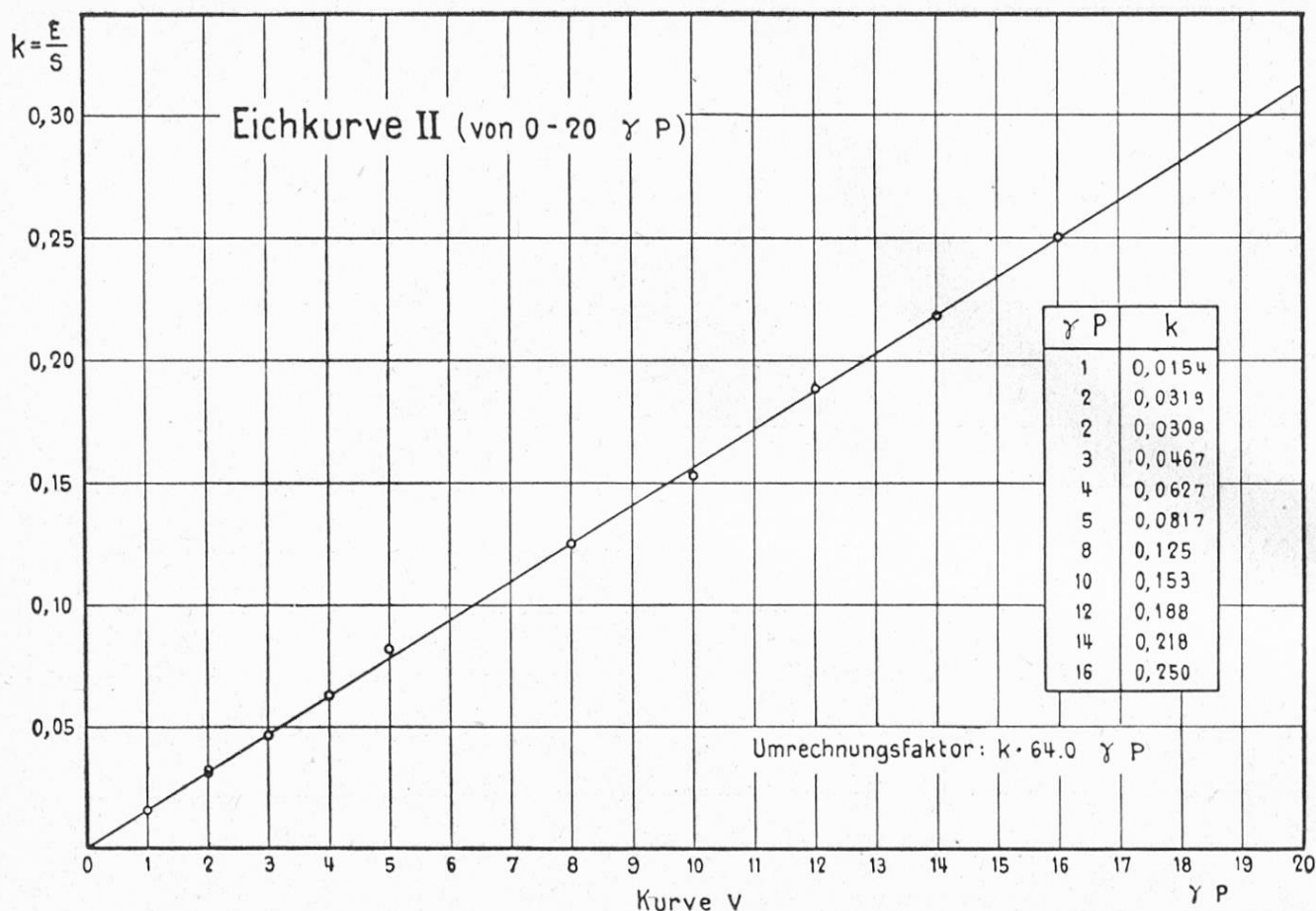
Filter = S 72 (Nr. 11)
 Totalvolumen 10 cc
 Temperatur 20°C



Der Verlauf der Eichkurve zeigt deutlich, dass die Beziehung zwischen der Farbintensität (k -Werte) und dem Phosphatgehalt der Lösung nur zwischen 0—50 γP graphisch aufgetragen eine Gerade ergibt. Bei grösserem PO_4''' -Gehalt nimmt der k -Wert nicht mehr im selben Masse zu. Der Schnitt der Eichkurve mit der $+X$ -Achse ist ein kleiner Schönheitsfehler und wohl auf nicht ganz richtige Einstellung des Photometers zurückzuführen. Von 0—50 γP gilt für die Kurve 4 die Beziehung: $\gamma P = (k \cdot 70,6) + 0,8$; alle im folgenden mitgeteilten Werte sind in diesem Kurvenbereich bestimmt und nach dieser Formel berechnet worden.

Es sei hier noch kurz auf die Wahl der Cuvetten hingewiesen. Die genauesten Werte erhält man, wenn die abgelesene Extinktion zwischen 0,3 und 1 beträgt. Das zur Messung verfügbare Volumen von 10 cc Flüssigkeit reicht zur Füllung der 1 und 2 cm-Cuvetten. Für die Benutzung der 3 cm-Cuvetten muss der Ansatz verdoppelt werden. Bei einer gegebenen Farbtiefe hat man es daher durch Wahl der geeigneten Cuvettenlänge in der Hand, die Extinktion in das gewünschte Gebiet fallen zu lassen.

Interessehalber haben wir auch noch Verdünnungen der Lösung I in 5 cm-Mikrocuvetten durchgemessen. Die erhaltenen Werte haben wir in Kurve 5 wiedergegeben. An Hand von hier nicht aufgeführten Versuchsreihen konnten wir feststellen, dass man mit dieser Anordnung zwischen 1 und 20 γP mit einer Genauigkeit von $\pm 0,5 \gamma P$ und einer Erfassungsgrenze von 1 γP arbeiten kann.



Über die absolute Menge Phosphor, welche mit der beschriebenen Methode quantitativ noch erfasst werden kann, sei hier kurz folgendes angefügt: Wenn nach Kurve 4 in 3 cm-Cuvetten mit doppeltem Ansatz (20 cc Totalvolumen) gearbeitet wird, stehen nach Tabelle 4 maximal 16 cc Versuchslösung zur Verfügung. Da die untere Grenze der genau messbaren Extinktion 0,1 beträgt, wird $E/S = 0,1 : 3 = k = 0,033$; dies entspricht einer Menge von 3 γ P. Mit Mikrocuvetten von 5 cm Länge und unter Benutzung von Kurve 5 kommt man noch tiefer. Wir konnten feststellen, dass sich 1 γ P noch gut reproduzierbar bestimmen lässt. Aber auch damit ist die untere Grenze noch nicht erreicht. Die Firma C. Zeiss liefert noch Cuvetten von 15 cm Länge, für deren Füllung ein einfacher Ansatz genügt. Es lässt sich leicht errechnen, dass nach Kurve 5 noch 0,4 γ P bestimmt werden könnten.

g) *Genaue Arbeitsvorschrift:*

Reagenzien: Schwefelsäure 1 + 3, Salpetersäure $D = 1,40$, 5%ige Lösung von Ammoniummolybdat.

Redox-Reagenz: 195 cc einer 15%igen Lösung von Kaliummetabisulfit oder Natriumbisulfit werden mit 0,5 g «Eikonogen» oder «Photo-Rex» versetzt, unter Umschwenken 5—30 cc einer 20%igen Na_2SO_3 -Lösung zugesetzt, je nach der zur völligen Lösung nötigen Menge, und hierauf filtriert und in einer gut schließenden braunen Flasche aufbewahrt.

1. Mineralisierung der Substanz:

a) *Flüssigkeiten.* 0,2—5 cc Flüssigkeiten (je nach dem zu erwartenden Phosphatgehalt) werden in einem *Jenaer*-Reagenzglas 150×15 mm mit 0,55 cc H_2SO_4 1+3 versetzt und unter portionenweiser Zugabe von konz. HNO_3 (Total 2—3 cc) über freier Flamme so lange erhitzt, bis die Flüssigkeit völlig farblos geworden ist und weisse SO_3 -Dämpfe auftreten. Hierauf lässt man erkalten, fügt wenig Wasser hinzu (zur Zersetzung der gebildeten Nitrosylschwefelsäure) und raucht nochmals leicht ab.

b) *Feste Substanzen.* 1 g Substanz wird mit 1 cc n/1 Calcium-Acetatlösung befeuchtet und, wie auf S. 278 beschrieben, verbrannt. Die hellgraue bis weisse Asche wird mit 4—6 Tropfen konz. Schwefelsäure und Wasser aufgenommen, in einen Messkolben von 100 cc übergeführt und zur Marke aufgefüllt. Je nach dem Phosphatgehalt muss eventuell stärker verdünnt werden.

2. Colorimetrie:

Zu dem erkalteten Inhalt des Reagenzglases gemäss 1a) oder zu einer entsprechenden Menge der Lösung gemäss 1b) fügt man nun nacheinander 1 cc 5%ige Ammoniummolybdatlösung, Wasser (in einer Menge, dass zum Schluss 10 cc Gesamtlösung vorliegen) und 0,5 cc Redox-Reagenz. Die Flüssigkeit wird durch zweimaliges Überschütten in ein zweites Reagenzglas gemischt und in ein Wasserbad von $20^\circ \text{C} \pm 1^\circ \text{C}$ eingesetzt. Gleichzeitig bereitet man sich eine Blindprobe aus 0,5 cc H_2SO_4 1+3, 1 cc Ammoniummolybdatlösung, 8 cc Wasser und 0,5 cc Redox-Reagenz und setzt sie ebenfalls in das Wasserbad ein. Nach 12—14 Minuten werden die Proben herausgenommen und in die Cuvetten von entsprechender Länge übergeführt. Die Messung erfolgt nach genau 15 Minuten unter Verwendung von Filter S 72 oder S 75. Die Trommel desjenigen Strahlenganges, in welchem sich die Probelösung befindet, dreht man ganz auf ($E = 0$) und blendet durch Drehen der Trommel den anderen Strahlengang, in welchem sich die Blindprobe befindet, solange ab, bis beide Hälften des Gesichtsfeldes gleich hell erscheinen. Man liest auf der roten Teilung die Extinktion E ab und wiederholt die Einstellung noch 4—5 mal. Das Mittel der Ablesungen wird durch die Länge der verwendeten Cuvetten dividiert und die zu dem so erhaltenen k -Wert gehörige Phosphatmenge aus einer Eichkurve entnommen. Die Eichkurve stellt man sich zweckmässig mit Lösungen von reinem KH_2PO_4 «Merk» her und kann damit den Umrechnungsfaktor ableiten.

Bemerkung: Es sei noch erwähnt, dass Kieselsäure und Arsensäure die gleiche Reaktion geben wie die Phosphorsäure. Die Arsensäure dürfte nur unter aussergewöhnlichen Umständen und auch dann nur in sehr geringen Mengen auftreten. Mit Störungen von dieser Seite braucht im allgemeinen nicht gerechnet zu werden. Die Kieselsäure wird bei der trockenen Verbrennung unlöslich und bei der nassen Verbrennung durch die starke Säure ausgefällt, so dass auch ihre Anwesenheit keine Fehlerquelle bedeutet.

IV. Anwendung auf die Untersuchung von Lebensmitteln

An flüssigen Lebensmitteln haben wir Wein und Süssmost sowie Milch untersucht. Wir sind dabei folgendermassen vorgegangen:

1. Gravimetrische Bestimmung:

50 cc Flüssigkeit und 1 cc n/1 Calciumacetatlösung wurden in der Platinschale zur Trockne eingedampft und über freier Flamme verascht. Lösen des Rückstandes mit 7 Tropfen konz. HNO_3 und Überspülen in ein 100 cc-Becherglas, auffüllen auf 25 cc, zum Sieden erhitzen, umschwenken und mit 25 cc Lorenzlösung fällen. g Niederschlag multipliziert mit 0,03314 und 20 = g P_2O_5 im Liter.

Bei Milch wurden, des hohen P_2O_5 -Gehaltes wegen, nur 10 cc zur Bestimmung verwendet.

2. Colorimetrische Bestimmung:

a) Trockene Verbrennung: 4 cc Lösung in einer Platinschale mit 1 cc n/10 Calciumacetat zur Trockne eingedampft und über freier Flamme verascht. Rückstand mit 4—6 Tropfen konz. H_2SO_4 und Wasser versetzt und in einen 100 cc-Messkolben gespült und aufgefüllt.

Von dieser Lösung wurden 6, 7 und 8 cc nach dem in Tabelle 4 angegebenen Schema zur Colorimetrie verwendet. Man bestimmt also den Phosphatgehalt derselben Lösung über drei verschiedene Punkte der Eichkurve. Jedes Resultat wird gesondert auf 100 cc mineralisierte, resp. 4 cc Ausgangslösung berechnet.

Für unsere Eichkurve gilt folgender Ansatz:

$$\begin{array}{l} \text{für 6 cc:} \\ \text{für 7 cc: } [(k \cdot 70,6) + 0,8] \cdot \begin{Bmatrix} 16,66 \\ 14,3 \\ 12,5 \end{Bmatrix} \cdot 2,5 \cdot 2,289 \cdot 10^{-4} = \text{gr. } \text{P}_2\text{O}_5 / \text{Lt.} \\ \text{für 8 cc:} \end{array}$$

Der Faktor 2,289 dient der Umrechnung von P in P_2O_5 , da wir unsere Eichkurve nach γ P aufgestellt haben.

Für 8 cc gibt es, bei Zusammenzug der verschiedenen Faktoren, folgende Formel:

$$[(k \cdot 70,6) + 0,8] \cdot 0,00715_3 = \text{gr. } \text{P}_2\text{O}_5 / \text{Liter fl. Lebensmittel.}$$

b) Nasse Verbrennung: Auf die gleiche Weise, wie wir die nasse Verbrennung der Saccharosehaltigen Modellösungen durchführten, wurde hier 1 cc einer Lösung 1+4 mit 0,55 cc H_2SO_4 (1+3) und konz. HNO_3 verbrannt. Der mit Wasser nochmals verdünnte und wieder abgerauchte Rückstand wird mit 1 cc Molybdat, 8,3 cc Wasser und 0,5 cc Redox-Reagenz versetzt und 15 Minuten entwickelt. Ausrechnung:

$$[(k \cdot 70,6) + 0,8] \cdot 5 \cdot 2,289 \cdot 10^{-3} = \text{gr. } \text{P}_2\text{O}_5 / \text{Lt.}$$

oder vereinfacht:

$$[(k \cdot 70,6) + 0,8] \cdot 0,0114_5 = \text{gr. } \text{P}_2\text{O}_5 / \text{Lt.}$$

Tabelle 5

Lebensmittel	G oder C	V	gr P ₂ O ₅ /Lt.	Mittel			Nr.
				G	C trocken	C nass	
Wein (Neuchâtel)	G	trocken	0,240	0,240	0,263	0,244	10 c
	C	trocken	0,274				10 b
	C	trocken	0,252				10 b
	C	nass	0,244				10 a
Wein (3. Pressung)	G	trocken	0,329	0,329	0,340	0,331	11 a
	G	trocken	0,330				11 a
	C	trocken	0,338				11 c
	C	trocken	0,343				11 c
	C	nass	0,332				11 b
	C	nass	0,347				11 b
	C	nass	0,314				11 b
Tresterwein (Piquette)	G	trocken	0,100	0,106	0,124	0,114	12 a
	G	trocken	0,112				12 a
	C	trocken	0,120				12 c
	C	trocken	0,129				12 c
	C	nass	0,113				12 b
	C	nass	0,115				12 b
Süssmost R.	G	trocken	0,162	0,161	0,168	0,169	13 a
	G	trocken	0,161				13 a
	C	trocken	0,168				13 c
	C	trocken	0,168				13 c
	C	nass	0,168				13 b
	C	nass	0,170				13 b
	C	nass	0,171				13 b
Süssmost O.	G	trocken	0,137	0,137	0,140	0,145	14 a
	G	trocken	0,138				14 a
	C	trocken	0,140				14 c
	C	nass	0,146				14 b
	C	nass	0,144				14 b
	C	nass	0,144				14 b
Süssmost St.	G	trocken	0,176	0,176	0,177	0,188	15 a
	G	trocken	0,176				15 a
	C	trocken	0,171				15 c
	C	trocken	0,184				15 c
	C	nass	0,187				15 b
	C	nass	0,188				15 b
Süsswein (Vin de Porto)	G	trocken	0,228	0,227	0,245	0,229	16 a
	G	trocken	0,227				16 a
	C	trocken	0,247				16 c
	C	trocken	0,243				16 c
	C	nass	0,225				16 b
	C	nass	0,234				16 b
Milch	G	trocken	2,144	2,144	2,130	2,120	19 a
	C	trocken	2,130				19 c
	C	trocken	2,130				19 c
	C	nass	2,100				19 b
	C	nass	2,090				19 b
	C	nass	2,170				19 b

G = gravimetrische Bestimmung, C = colorimetrische Bestimmung, V = Art der Verbrennung

Schliesslich haben wir noch 3 feste Lebensmittel vergleichend auf ihren Phosphatgehalt untersucht. Wir verwendeten Backmehl, Volleipulver und Vollfettkäse.

1. Backmehl: Zur gravimetrischen Bestimmung wurden 5 g verascht. Zur trockenen Verbrennung für die colorimetrische Bestimmung verwendeten wir 1 g und füllten auf 500 cc auf. Bei der nassen Verbrennung wurde 1 g mit 5 cc konz. H_2SO_4 und konz. HNO_3 im *Kjeldahl*kolben versetzt und bis zur Farblosigkeit abgeraucht. Hierauf mit einigen Tropfen Wasser verdünnt, nochmals abgeraucht und auf 500 cc aufgefüllt. Von dieser Lösung wurden 3 cc mit 0,38 cc H_2SO_4 (1 + 3), 5,12 cc Wasser, 1 cc Molybdat und 0,50 cc Redox-Reagenz versetzt und entwickelt.
2. Volleipulver: zur gravimetrischen Bestimmung 3 g, zur colorimetrischen Bestimmung für die nasse und trockene Verbrennung je 1 g und Auffüllen auf 500 cc.
3. Käse: zur gravimetrischen Bestimmung 2 g, zur colorimetrischen Bestimmung durch nasse Verbrennung 1 g und Auffüllen auf 500 cc, durch trockene Verbrennung 0,5 g und Auffüllen auf 250 cc.

Tabelle 6

Lebensmittel	G oder C	V	gr P_2O_5 /Kg.	Mittel			Nr.
				G	C trocken	C nass	
Backmehl	G	trocken	0,860	0,854	0,874	0,870	17 a
	G	trocken	0,848				17 a
	C	trocken	0,874				17 c
	C	trocken	0,875				17 c
	C	nass	0,865				17 b
	C	nass	0,875				17 b
Volleipulver	G	trocken	1,520	1,520	1,572	1,537	18 a
	C	trocken	1,580				18 c
	C	trocken	1,565				18 c
	C	nass	1,540				18 b
	C	nass	1,535				18 b
Gruyère vollfett (Hartkäse)	G	trocken	1,439	1,436	1,442	1,438	20 a
	G	trocken	1,434				20 a
	C	trocken	1,442				20 c
	C	trocken	1,442				20 c
	C	nass	1,438				20 b
Gruyère vollfett (Schmelzkäse)	G	trocken	1,090	1,095	1,096	1,095	21 a
	G	trocken	1,100				21 a
	C	trocken	1,108				21 c
	C	trocken	1,085				21 c
	C	nass	1,090				21 b
	C	nass	1,100				21 b

G = gravimetrische Bestimmung, C = colorimetrische Bestimmung, V = Art der Verbrennung

Wenn man die einzelnen Daten der beiden Tabellen 5 und 6 näher betrachtet, so fällt auf, dass in den meisten Fällen die Resultate der nassen Verbrennung den gravimetrisch ermittelten P-Werten näher kommen. In jedem Falle (ausser bei Milch) sind die gravimetrisch ermittelten Resultate am niedrigsten. Angesichts der sehr kleinen, zur Wägung gelangenden Substanzmengen ist es denkbar, dass die Löslichkeit des Ammoniumphosphormolybdates hier doch schon eine Rolle spielt.

Wird die Schwankungsbreite der Werte bei Doppelbestimmungen in Rechnung gesetzt, so ergibt sich bei der gravimetrischen Bestimmung eine mittlere Abweichung von 1,85 %. Bei der colorimetrischen Methode nach vorangegangener trockener Verbrennung beträgt dieser Wert 2,72 %, nach nasser Mineralisation 2,33 %. Die colorimetrische Phosphatbestimmung kann damit als brauchbare Schnellmethode angesprochen werden.

Zusammenfassung

Die von *Theorell* modifizierte, colorimetrische Phosphatbestimmungsmethode nach *Fiske-Subbarow* wird unter Berücksichtigung verschiedener Faktoren eingehend überprüft. In etwas abgeänderter Form gelangt sie schliesslich zur praktischen Anwendung. Die Methode liefert zwar etwas weniger genaue Werte als die gravimetrische Bestimmung nach *Lorenz*. Da die zur Bestimmung benötigte Substanzmenge jedoch stark verringert werden kann, ist sowohl der Zeit- als auch der Materialaufwand ganz wesentlich geringer, so dass eine Anwendung in Fällen möglich wird, wo bisher davon abgesehen werden musste.

Résumé

La méthode colorimétrique de dosage des Phosphates d'après *Fiske-Subbarow*, modifiée par *Theorell*, est contrôlée exactement en tenant compte de différents facteurs. Finalement on peut l'appliquer pratiquement sous une forme quelque peu modifiée. La méthode donne cependant des valeurs moins exactes que le dosage gravimétrique d'après *Lorenz*. Mais comme la quantité de substance nécessaire par le dosage peut être fortement réduite, la dépense de temps et aussi de matériel est très sensiblement plus faible, de sorte qu'une application devient possible dans les cas où jusqu'ici il fallait en faire abstraction.

Literatur

- 1) *Wuhrmann*, Mitt. 34, 338 (1943).
- 2) *Högl*, Protokoll der 89. Sitzung des Verbandes der Kantons- und Stadtchemiker d. Schweiz v. 17. Dez. 1937.
- 3) Handbuch der Lebensmittelchemie II/2 S. 1262, Berlin 1935.
- 4) *Mohler, Hämmerle und Hartnagel*, Mitt. 32, 99 (1941).
- 5) *Fiske-Subbarow*, J. of. Biol. Chem. 66, 375 (1925).
- 6) *Theorell*, Biochem. Ztschr. 230, 1. (1931).
- 7) *Tschopp*, Helv. chim. acta 15, 793 (1932).
- 8) *Folin*, J. Biol. Chem. 51, 386 (1922).