

Acetyltritylamin.

1.) Aus dem Versuch einer Umsetzung mit Tritylisocyanat zurückgewonnenes Präparat vom Schmp. 214°.

$C_{21}H_{19}ON$ (301.4) Ber. C 83.69 Gef. C 84.59, 84.38, 83.59, 84.02
 „ H 6.35 „ H 6.45, 6.61, 6.18, 6.24
 „ N 4.65 „ N 4.57, 4.55, 4.23, 4.27.

$C_{41}H_{34}O_2N_2$ (586.7) (Acetylditrylarnstoff) Ber. C 83.93 H 5.81 N 4.78.

2.) Darstellung aus Acetamid und Tritylchlorid: 11.2 g Tritylchlorid und 9.5 g Acetamid (4 Mol.) werden bei einer Ölbadtemp. von 180–200° 30 Min. unter öfterem Umrühren verschmolzen. Die homogene Masse liefert nach dem Erkalten und Umkrystallisieren aus Alkohol 4.6 g (38% d.Th.) Acetyltritylamin vom Schmp. 214°.

74. Eugen Bamann, Elfriede Nowotny und Liselotte Rohr: Zur colorimetrischen Bestimmung der Phosphorsäure (Einfluß der Säurekonzentration auf die Reduktion der Phosphormolybdänsäure durch Aminonaphtholsulfonsäure).

[Aus dem Pharmazeut. Institut der ehemaligen Deutschen Karls-Universität in Prag.]
 (Eingegangen bei der Redaktion der Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft am 9. Januar 1945.)

Es wurde der Einfluß der Säurekonzentration auf die Reduktion der Phosphormolybdänsäure durch Aminonaphtholsulfonsäure bei der colorimetrischen Bestimmung der Phosphorsäure nach C. H. Fiske und Y. Subbarow untersucht. Wichtig ist, daß bei Einhaltung einer Entwicklungszeit von 15 Min. der theoretische oder fast theoretische Phosphorsäure-Wert auch dann gefunden wird, wenn an Stelle der vorgeschriebenen Acidität (n H_2SO_4) Aciditäten entsprechend 0.7 bis 1.3 n vorliegen. In diesen Grenzen ist zwar der Entwicklungsverlauf durchaus verschieden, aber nach Erreichung der Farbtiefe, die der anwesenden Phosphorsäuremenge entspricht, schreitet die Farbentwicklung in der bis zur festgesetzten Entwicklungsdauer von 15 Min. verbleibenden restlichen Zeit nunmehr so langsam voran, daß sie nicht ins Gewicht fällt.

Unter den colorimetrischen Verfahren zur Bestimmung der Phosphorsäure¹⁾ ist dasjenige, das Phosphormolybdänsäure mit 1-Amino-naphthol-(2)-sulfonsäure-(4) bzw. dem 2.1.6-Isomeren²⁾ („Eikonogen“) zu „Molybdänblau“ reduziert, ein für viele Zwecke besonders geeignetes. Es ist im Jahre 1925 von C. H. Fiske und Y. Subbarow³⁾ vorgeschlagen und kurze Zeit später durch K. Lohmann und L. Jendrassik⁴⁾ zu seiner heute angewandten Form⁵⁾ gestaltet worden.

Dieses Verfahren weist gegenüber den bisherigen colorimetrischen Bestimmungsmethoden bzw. den dabei benützten verschiedenartigen Reduktionsmitteln einige wesentliche Vorzüge auf. Dazu kommt, daß bereits eine Reihe von Beobachtungen bekannt sind, die

¹⁾ Umfassende Stellungnahmen zu den jeweils bekannten Verfahren finden sich bei H. Kleinmann, Biochem. Ztschr. 99, 19 [1919]; C. H. Fiske u. Y. Subbarow, Journ. biol. Chem. (Am.) 66, 375 [1925]; H. K. Barrenscheen, Mikrochem. 7, 127 [1929]; F. Feigl, ebenda, S. 116; R. Strebing, ebenda, S. 119; E. Tschopp u. E. Tschopp, Helv. chim. Acta 15, 793 [1932]; B. Lange, Kolorimetr. Analyse, Berlin 1941. Über den Mechanismus des Reduktionsvorgangs s. u. a. F. Feigl u. P. Krumholz, B. 62, 1138 [1929]; E. Tschopp u. E. Tschopp, s. oben.

²⁾ Auch die 2.3.6- und 2.8.6-Isomeren eignen sich vorzüglich (B. Vászárhegyi, Mikrochem., Pregl-Festschr., S. 329 [1929]).

³⁾ Journ. biol. Chem. (Am.) 66, 375 [1925].

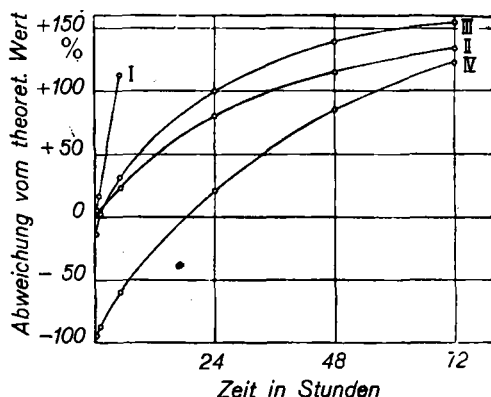
⁴⁾ Biochem. Ztschr. 178, 419 [1926].

⁵⁾ S. z. B.: E. Bamann u. K. Myrbäck, Die Methoden der Fermentforschung, S. 1605, Leipzig 1941, New York 1945.

sich auf den Einfluß bzw. die Berücksichtigung oder Ausschaltung von schon vorhandenen oder zusätzlichen Stoffen beziehen, welche die Farbentwicklung stören.

Diesen Erfahrungen möchten wir einige gelegentliche Beobachtungen anfügen, die den Einfluß der Säurekonzentration auf den Reduktionsvorgang betreffen. Diese Frage, zu der wir eine Stellungnahme qualitativer Art bereits E. Tschopp und E. Tschopp⁶⁾ verdanken, hat für manche Untersuchungen ein besonderes Interesse.

Unter den bisher üblichen Bedingungen des Verfahrens vollzieht sich die Reduktion in *n* schwefelsaurem Medium. Bei dieser Acidität verläuft die Farbbildung zu Beginn der Entwicklung verhältnismäßig rasch und steigt nach 15 Min. nur noch langsam an, so daß die Colorimetrie mit genügend Sorgfalt und Zeitaufwand erfolgen kann. Allerdings macht die Farbvertiefung nicht völlig halt; nach Ablauf von insgesamt einer Stunde (15 Min. unter den Bedingungen des Verfahrens, 45 Min. bei 20°) beträgt die Abweichung vom theoret. Wert + 3 %, nach 24 Std. + 81 %, nach 10 Tagen + 176 % und nach 15 Tagen + 180 %. Bei noch längerer Einwirkungsdauer schreitet die Farbvertiefung bei 20° nur noch sehr langsam voran; sie erreicht nach 30 Tagen einen Wert, der einer Abweichung von +185 % entspricht. Wird die Entwicklung bei einer von der *n* Lösung verschiedenen Acidität vorgenommen, so ist der zeitliche Verlauf der Farbbildung ein anderer, selbst bei nur geringen Abweichungen von der Norm-Acidität des Verfahrens. Und zwar bewirkt eine höhere Säurekonzentration in den Anfangszeiten zunächst eine Verzögerung der Entwick-



Abbild. Einfluß der Säurekonzentration auf den Reaktionsvorgang.

Kurve I: Entwicklung in 0.5 *n* H₂SO₄
 „ II: „ „ 1.0 „ „ (Norm-Acidität des Verfahrens)
 „ III: „ „ 1.5 „ „
 „ IV: „ „ 2.0 „ „

lung, später aber übertreffen diese Lösungen an Farbtiefe die unter den Bedingungen des Verfahrens durchgeführten; im Laufe längerer Versuchsdauer, nämlich nach sieben und mehr Tagen, gleicht sich dann die Farbtiefe des Normalversuches derjenigen der anderen Versuche an. Einen Überblick über diese Verhältnisse und die quantitativen Ausmaße der beschriebenen Erschei-

⁶⁾ Helv. chim. Acta 15, 793 [1932].

nungen gewährt die Abbildung, deren Ergebnisse durch die Tafel ergänzt werden.

Tafel. Abweichung vom theoretischen Wert der Phosphorsäure bei verschiedenen Säuregraden und Entwicklungszeiten (die Zahlen bedeuten Prozente).

Entw. Dauer (Stdn.)	Säuregrad des Verfahrens											
	0.5 n	0.6 n	0.7 n	0.8 n	0.9 n	1.0 n	1.2 n	1.3 n	1.4 n	1.5 n	2.0 n	3.0 n
$\frac{1}{4}$ (Entw. Zeit d. Meth.)	+6	+3	±0	±0	±0	±0	±0	-1	-2	-14	-95	-100
1	+17	+7	+3	+2	+2	+3	+3	+5	+5	+1	-88	-100
5	+113	+78	+28	+24	+24	+24	+28	+29	+32	+32	-60	-100
24				+78	+78	+81	+84	+89	+94	+100	+21	-100
48				+112	+112	+115	+125	+129	+135	+140	+86	-100
72			← Zunehmende Trübung bzw. Ausfallen des Farbstoffes	+132	+132	+134	+142	+148	+149	+155	+123	-100
96				+150	+150	+150	+158	+160	+163	+164	+146	-100
240				+185	+176	+176	+176	+176	+176	+176	+176	-100
360				—	+180	+180	+180	+180	+180	+180	+180	-100
720					+185	+185	+185	+185	+185	+185	+185	-100

Von Bedeutung für die praktische Anwendung des Verfahrens ist, daß bei Einhaltung der Entwicklungszeit von 15 Min. innerhalb der Aciditätsgrenzen 0.7–1.3 n die theoretischen oder fast theoretischen Werte für die zu bestimmende Phosphorsäuremenge gefunden werden. In diesen Grenzen ist zwar der Entwicklungsverlauf durchaus verschieden, indem beispielsweise in 0.7 n Lösung volle Farbtiefe schon vor 1 Min., in 1.0 n Lösung in etwa 1 Min., in 1.2 n Lösung nach etwa 3 Min. und in 1.3 n Lösung nach etwa 5 Min. eintritt; aber die weitere Farbentwicklung in der restlichen Zeit der Entwicklungsdauer schreitet nunmehr so langsam voran, daß sie nicht ins Gewicht fällt. Innerhalb der angegebenen Aciditäten zeigen also nach Ablauf von 15 Minuten Entwicklungszeit alle Versuche praktisch die gleiche Farbtiefe. Vermieden werden müssen demnach Säuregrade unter 0.7 n und über 1.3 n. Im ersteren Falle ergeben sich nach 15 Min. Entwicklungszeit bereits zu hohe Werte, im letztgenannten zu niedrige (s. die Tafel).

Bei Lösungen < 0.7 n treten nach längeren Zeiten (10–24 Stdn.) mit abnehmender Acidität zunehmende Trübungen bzw. Ausfällungen an Farbstoff auf, so daß Farbmessungen nicht mehr vorgenommen werden können. In abnorm sauren, z. B. 2 n Lösungen ist die anfängliche Verzögerung der Farbentwicklung nicht nur sehr stark, sondern in Parallelversuchen gleichen Säuregrads auch verschieden stark. Es sind bisher unerkennbare äußere Einflüsse, die das Ausmaß der Verzögerung bestimmen und die Reproduzierbarkeit erschweren. Der in der Abbildung dargestellte Reaktionsverlauf im Falle einer 2 n Lösung gibt einen Versuch mit mittelstarker Verzögerung wieder. In den nach Tagen erreichten Endwerten kommt es aber wieder zu einer Gleichheit der Farbtiefe. In 3 n Lösung unterbleibt die Reduktion zu Molybdänblau; selbst nach sehr langen Einwirkungszeiten sind die Lösungen völlig farblos.

Die nach etwa 30 Tagen bei 2⁰ erhaltene Farbtiefe stellt nicht, wie man aus den für die verschiedenen Säuregrade übereinstimmenden Endwerten der Tafel schließen könnte, das überhaupt erreichbare Farbmaximum dar; das

ist nur bei den Versuchen in stärker saurem Medium der Fall: In 2 *n* Lösungen beispielsweise kann die nach 30 Tagen erreichte Farbtiefe (entsprechend +185% Abweichung) weder durch weitere Entwicklung bei bedeutend höheren Temperaturen (Verweilen des Ansatzes während 5 Min. im siedenden Wasserbad) noch durch Hinzufügen zusätzlicher Entwicklerlösung verstärkt werden. Entwicklungen, die bei diesem Säuregrad von Anfang an bei höheren Temperaturen durchgeführt werden, erreichen die gleiche Farbtiefe (5 Min. bei 100°: +185% Abweichung). In den Versuchen geringerer Acidität (1.5 *n*, 1.2 *n*, 1.0 *n* und 0.9 *n*) beobachtet man indes bei Erhöhung der Temperatur ein Fortschreiten der bei 20° praktisch zum Stillstand gekommenen Entwicklung, die zu um so stärkerer Farbvertiefung führt, je geringer der Säuregrad der Lösung ist. Dementsprechend geben innerhalb dieser Aciditätsbereiche auch von Anfang an bei 100° vorgenommene Entwicklungen innerhalb kurzer Zeit, z. B. 5 Min., weit größere Farbtiefen als solche nach 30 Tagen bei 20°. Daraus ergibt sich, daß der Säuregrad der Lösung nicht nur auf den zeitlichen Verlauf der Entwicklung, sondern auch auf das erreichbare Farbmaximum von Einfluß ist. Dies ist besonders wichtig, weil bei dem colorimetrischen Verfahren von Sch. Zinzadze⁷⁾, das als Reduktionsmittel das „Molybdänblau-Reagens“ (mit Molybdän reduzierte Molybdänsäure) benutzt, die Erreichung voller Farbtintensität entweder durch längere Einwirkungsdauer bei niederen Temperaturen (3 Tage bei 20–30°) oder durch hohe Temperaturen bei kurzer Entwicklungszeit (4–5 Min. bei 100°) als möglich bezeichnet wird.

Beschreibung der Versuche.

Unter den Bedingungen des Verfahrens, 5 ccm Molybdänsäurelösung (2.5% Ammoniummolybdat in 5 *n* H₂SO₄) sowie 1 ccm Reduktionsmittellösung (0.5 g gereinigte Aminonaphtholsulfonsäure in 195 ccm 15-proz. Natriumhydrogensulfatlösung + 5 ccm⁸⁾ 20-proz. Natriumsulfatlösung) im Reaktionsvolumen von 25 ccm, vollzieht sich die Reduktion in 1 *n* schwefelsaurer Lösung. Die geringe Erhöhung der Acidität durch die Reduktionsmittellösung kann vernachlässigt werden; denn 1 ccm entspricht nur etwa 1.2 ccm einer *n* Säure. Die Entwicklung nimmt man 5 Min. bei 37° und anschließend 10 Min. bei 20° vor. Bei einer etwaigen Auskrystallisation des Entwicklers im Ansatz dürfen nur abgesetzte, klare Proben zur colorimetrischen Bestimmung gelangen, da Messungen von Proben, die Kryställchen suspendiert enthalten, größere Farbtintensität vortäuschen. Zur Bestimmung der Farbtiefe bedienen wir uns des lichtelektrischen Colorimeters nach B. Lange.

Die mitgeteilten Ergebnisse über den Einfluß der Säurekonzentration auf die Reduktion der Phosphormolybdänsäure sind erhalten unter Zugrundelegung von 0.100 mg P₂O₅ in Form von KH₂PO₄. Erhöhung des Säuregrads über die Norm des Verfahrens wurde durch Zugabe entsprechender Mengen Schwefelsäure⁹⁾, Erniedrigung unter die Norm durch Zufügen entsprechender Mengen Ammoniaklösung erzielt; die Versuche unter den letztgenannten Bedingungen enthalten demnach mehr Ammoniumsulfat¹⁰⁾.

⁷⁾ Pflanzenernährung, Düngung u. Bodenkunde, Tl. A, 16, 126 [1930], 23, 447 [1932]; Ind. engin. Chem. 27, 24 [1935]; vergl. a. B. Lange, Kolorimetr. Analyse, Berlin 1941, S. 288 usw.

⁸⁾ Meistens wird Lösung der Sulfonsäure erst bei Zugabe von etwas mehr Sulfatlösung erreicht.

⁹⁾ In Versuchen, in denen die Erhöhung des Säuregrads durch Salzsäure bewirkt wurde, ergaben sich die gleichen Werte.

¹⁰⁾ Die Versuche mit 1.0 bis 0.7 *n* Lösungen lassen also auch den Schluß zu, daß Ammoniumsalze in der vorliegenden Konzentration (0.3 *n*) das Ergebnis nicht beeinträchtigen, in Übereinstimmung mit den Befunden von E. Tschopp und E. Tschopp. Dies ist besonders für die Phosphorsäurebestimmung in biologischem und biochemischem Untersuchungsmaterial wissenswert.