

**52. Stabilisierte Diazoniumsalze als Reagenzien zur Bestimmung von Dioxybenzolderivaten.**

**II. Über eine kolorimetrische Bestimmungsmethode des 1,2-Dioxybenzols, des Methylaminomethyl-[3,4-dioxy-phenyl]-carbinols und der  $\alpha$ -Amino- $\beta$ -[3,4-dioxy-phenyl]-propionsäure<sup>1)</sup>**

von P. Heinrich und W. Schuler.

(23. XII. 47.)

Unter den von uns dargestellten und beschriebenen<sup>1)</sup>, mit Naphthalinsulfosäure stabilisierten Diazoniumsalzen eignet sich das  $\alpha$ - (oder  $\beta$ ) - naphthalinsulfosaure 4 - Nitro - 2 - chlor - 1 - diazo - benzol (N.N.C.D.) am besten als Reagens zur kolorimetrischen Bestimmung von Dioxybenzolderivaten. Es löst sich praktisch farblos in Wasser und reagiert mit der erwähnten Stoffgruppe in saurem Milieu unter Bildung gelber Farbstoffe; diese Reaktion ist, wie wir zeigen werden, genügend empfindlich, für die genannte Körperklasse relativ spezifisch und bei entsprechender Temperatur und günstiger Wasserstoffionenkonzentration einfach und in angemessener Zeit durchführbar.

Die Empfindlichkeit des Reagens auf Dioxybenzolderivate ist unter den von uns ausgearbeiteten Bedingungen so gross, dass noch 0,05 γ der Dioxybenzole pro cm<sup>3</sup> sicher erfasst werden können; sie ist also grösser als die Empfindlichkeit des Folin'schen Reagens<sup>2)</sup> auf Adrenalin, erreicht jedoch nicht die des Reagens von Whitehorn<sup>3)</sup>. Die Empfindlichkeit des Whitehorn'schen Reagens kann jedoch auch mit unserem Reagens erreicht, wenn nicht übertroffen werden, wenn man die bei der Reaktion mit Dioxybenzolen entstehenden Farbstoffe mit einem geeigneten Extraktionsmittel ausschüttelt und entsprechend konzentriert. Auf diese Art der Empfindlichkeitssteigerung möchten wir aber erst später eingehen, wenn die Reaktionsprodukte unseres Reagens mit mehreren Dioxybenzolderivaten analysenrein vorliegen, und vorläufig nur erwähnen, dass die bisher rein dargestellten Reaktionsprodukte, auch das mit Adrenalin gewonnene, überraschende Stabilität aufweisen.

Ein besonderer Vorteil unserer Diazoreaktion gegenüber anderen, zur Bestimmung von biologisch wichtigen Phenolderivaten verwendeten Reaktionen, scheint uns zu sein, dass erstere in stark saurem Milieu mit der genannten Empfindlichkeit auf Dioxybenzole

<sup>1)</sup> 1. Mitteilung: *Helv.* **30**, 886 (1947); *Exper.* I, 235 (1945).

<sup>2)</sup> *O. Folin, W. B. Cannon und W. Denis, J. Biol. Chem.* **13**, 477 (1912).

<sup>3)</sup> *J. C. Whitehorn, J. Biol. Chem.* **108**, 633 (1935) — c. f. *N. L. Allport, Colorimetric Analysis*, Verlag Chapman and Hall, London, 1945.

durchführbar ist, diese also bei der Bestimmung nie dem zerstörenden Einfluss alkalischer Reaktion ausgesetzt werden müssen.

Die Spezifität unseres Reagens ist bedeutend grösser als die des Folin'schen Reagens, welche zu starker Kritik Anlass gegeben hat<sup>1)</sup>. Aber auch die Spezifität des Whitehorn'schen Reagens wird durch die des unseren übertroffen, soweit sich aus den vorliegenden Vergleichsangaben und aus unseren bisherigen Versuchen schliessen lässt: Unser Reagens reagiert zwar allgemein mit Dioxylbenzolderivaten, nicht aber mit Glutathion, Ascorbinsäure und Sympathol, Verbindungen, welche nach Whitehorn mit Arsenmolybdänsäure reagieren. Keine Reaktion in dem für biologische Untersuchungen in Betracht kommenden Konzentrationsbereich von unter 100 mg % geben mit unserem Reagens weiterhin aliphatische und aromatische Aminosäuren, Aldehyde und Ketone, Cystein und Cystin, Imidazol- und Indolderivate. Dagegen reagieren Pyridin- und Chinolinderivate sowie aromatische Diamine schon in relativ kleinen Mengen und müssen vor der Bestimmung der Dioxylbenzolderivate entfernt werden, was keine Schwierigkeiten macht. Im übrigen muss der Spezifitätsbereich unseres Reagens im Laufe der Zeit noch abgeklärt werden.

Bei der Bestimmung von Dioxylbenzolderivaten lässt sich die Spezifität offenbar dadurch noch wesentlich steigern, dass man, nach Ablauf der Reaktion im Sauren, die entstandene Farblösung alkaliert. Die Reaktionsprodukte mit verschiedenen Dioxylbenzolderivaten geben dann, wie schon mitgeteilt<sup>2)</sup>, zum Teil unterschiedliche Färbungen, worauf wir später zurückkommen werden.

Über die Milieuabhängigkeit der Reaktion des naphthalinsulfosauren 4-Nitro-2-chlor-1-diazo-benzoles mit Dioxylbenzolderivaten haben unsere Versuche folgendes ergeben:

Die Reaktion führt in saurem Milieu zur Bildung gelber Farbstoffe. Das Absorptionsspektrum der mit Adrenalin gewonnenen Farbstofflösung ist in Fig. 1 dargestellt.

Bestimmt man die Farbstärke mit dem Zeiss'schen Stufen-Photometer unter Verwendung des Filters S 43, so findet man, wie aus den Konzentrations-Durchlässigkeitskurven der Fig. 2a ersichtlich, in einem Konzentrationsbereich der Dioxylbenzole von 0—5 γ/cm<sup>3</sup> das Beer'sche Gesetz erfüllt. Das gleiche gilt für das Weka-Photometer von Kauhausen mit Schottfilter BG 12. Bei Bestimmung der Farbstärke mit dem lichtelektrischen Lumetron-Photometer 400 A Photovolt Corp., New York<sup>3)</sup> unter Verwendung des Filters Blue 420

<sup>1)</sup> H. Fujiwara und E. Kataoka, Z. physiol. Ch. 216, 133 (1933).

<sup>2)</sup> 1. Mitteilung: Helv. 30, 886 (1947).

<sup>3)</sup> Das Lumetron-Photometer 400A wurde uns von der CIBA Aktiengesellschaft, Basel, zur Verfügung gestellt, wofür wir bestens danken.

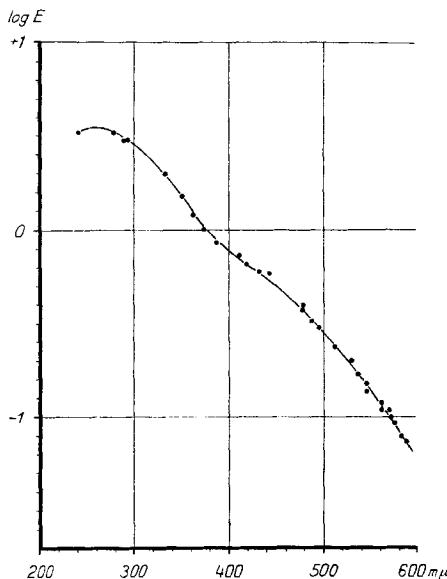


Fig. 1. Absorptionsspektrum der Reaktionslösung von Adrenalin mit 4-Nitro-2-chlor-1-diazo-benzol.  
( $p_H$  2,  $35^{\circ}$ , 1 Stunde)

Extinktionswerte der Reaktionslösung von Adrenalin ( $0,228 \cdot 10^{-4}$  Mol/L) und Diazo-reagens ( $0,409 \cdot 10^{-3}$  Mol/L)  
Abszisse: Wellenlänge in  $m\mu$

Ordinate:  $\log E$

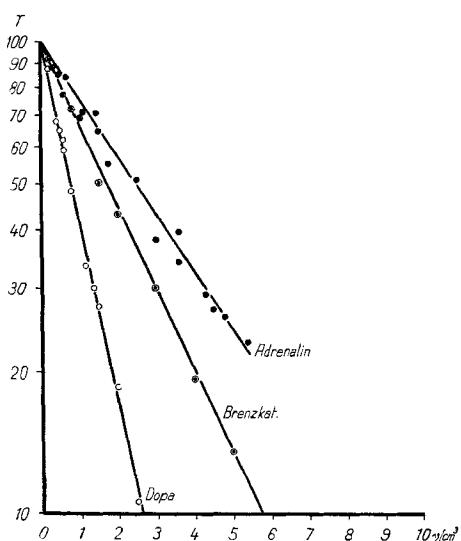


Fig. 2a. Konzentrations-Durchlässigkeitskurven der Reaktionslösungen dreier Dioxybenzolderivate gemessen im Pulfrich-Photometer.  
( $p_H$  1,  $20^{\circ}$ , 1 Stunde, Filter S 43,  $d = 30$  mm)

• Adrenalinreaktionslösung      ○ Brenzkatechinreaktionslösung  
Abszisse:  $\gamma/cm^3$       ○ Dioxyphenylalaninreaktionslösung      Ordinate: T

ist dies jedoch, wahrscheinlich der geringeren Selektivität des Filters wegen, nicht der Fall, wie aus den Konzentrations-Durchlässigkeitsskurven der Fig. 2b zu ersehen; in diesem Fall ist es notwendig, Eichkurven aufzustellen, bis eine günstige Filterkombination gefunden und erhältlich ist.

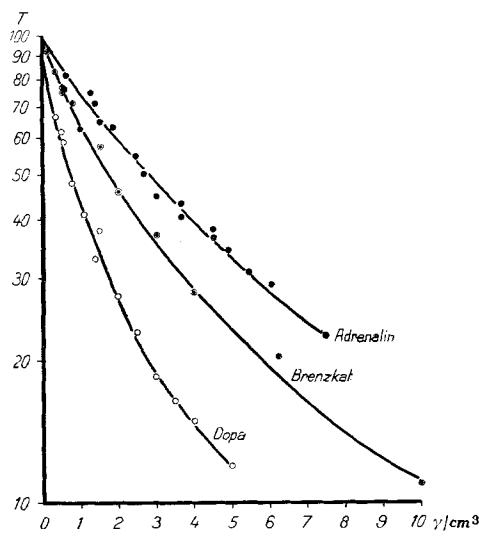


Fig. 2b.

Konzentrations-Durchlässigkeitsskurven der Reaktionslösungen dreier Dioxybenzolderivate gemessen im Lumetron-Photometer.  
( $p_{\text{H}}$  1, 20°, 1 Stunde, Filter Blue 420,  $d = 30 \text{ mm}$ )

- Adrenalinreaktionslösung
- Brenzkatechinreaktionslösung
- Dioxyphenylalaninreaktionslösung

Abszisse:  $\gamma/\text{cm}^3$ 

Ordinate: T

Die  $p_{\text{H}}$ -Abhängigkeit des Reaktionsverlaufes bei gleicher Temperatur und Zeit ist aus Fig. 3 am Beispiel der Adrenalinbestimmung zu ersehen. In einem  $p_{\text{H}}$ -Bereiche von 1—3 steigt mit steigendem  $p_{\text{H}}$ -Werte die Intensität der Farbstoffbildung an, bei  $p_{\text{H}}$ -Werten über 3 macht sich aber eine störende Lichtempfindlichkeit unseres Reagens an einem Ansteigen des Leerwertes bemerkbar, sodass als optimaler  $p_{\text{H}}$ -Bereich für die Reaktion des Diazoniumsalzes mit Dioxybenzolen ein  $p_{\text{H}}$  von 2—3 zu gelten hat.

Die Temperaturabhängigkeit des Reaktionsverlaufes bei gleichem  $p_{\text{H}}$  und gleich langer Zeit ist der Fig. 4 ebenfalls am Beispiel der Adrenalinbestimmung zu entnehmen. Als Temperaturopimum hat ein solches von ca. 35° zu gelten, höhere Temperaturen sind aus Gründen, die im experimentellen Teil erörtert werden, zu vermeiden.

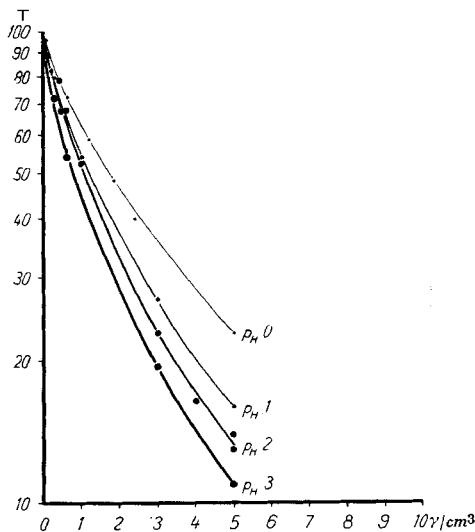


Fig. 3. Konzentrations-Durchlässigkeitsskurven einer Adrenalinreaktionslösung bei verschiedenen Wasserstoffionenkonzentrationen.

Messungen mit Lumetron-Photometer.

(35°, 1 Stunde, Filter Blue 420, d = 30 mm)

• Messwerte bei  $p_H 0$       • Messwerte bei  $p_H 1$       • Messwerte bei  $p_H 2$   
 Abszisse:  $\gamma/cm^3$       ● Messwerte bei  $p_H 3$       Ordinate: T

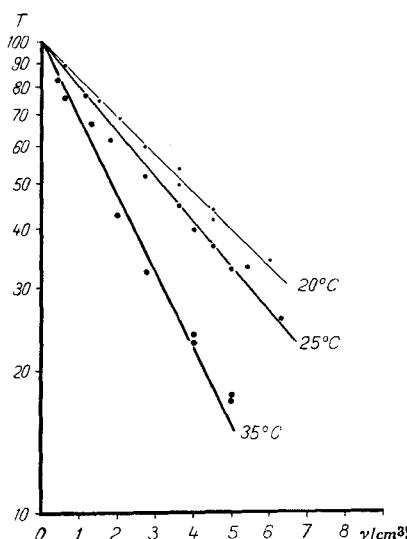


Fig. 4. Konzentrations-Durchlässigkeitsskurven einer Adrenalinreaktionslösung gemessen im Pulfrich-Photometer bei verschiedenen Temperaturen.

( $p_H 1$ , 1 Stunde, Filter S 43, d = 20 mm)

• Messwerte bei 20°      • Messwerte bei 25°      ● Messwerte bei 35°

Abszisse:  $\gamma/cm^3$       Ordinate: T

Die Zeitdauer des Reaktionsverlaufes ist, bei  $p_H$  1 und einer Temperatur von  $20^\circ$ , bei der sie experimentell leichter bestimmbar ist als bei  $35^\circ$ , der Fig. 5 zu entnehmen. Am besten hat sich eine Zeitdauer von einer Stunde erwiesen, welche bei einer Versuchstemperatur von  $35^\circ$  mit einer Genauigkeit von  $\pm 3$  Minuten eingehalten werden sollte.

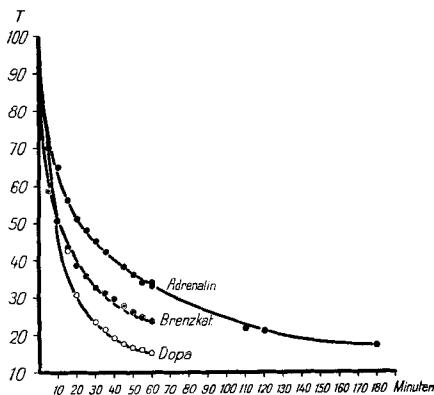


Fig. 5.

Zeitlicher Anstieg der Farbintensität (Abfall der Durchlässigkeit) der mit Diazoreagens versetzten Lösungen der drei Dioxybenzolderivate gemessen im Lumetron-Photometer.

( $p_H$  1,20 $^\circ$ , Filter Blue 420, d = 30 mm)

- Adrenalinreaktionslösung, enthaltend 5  $\gamma/cm^3$
- Brenzkatechinreaktionslösung, enthaltend 5  $\gamma/cm^3$
- Dioxyphenylalaninreaktionslösung, enthaltend 4  $\gamma/cm^3$

Abszisse: Zeit in Minuten

Ordinate: T.

Das Konzentrationsverhältnis zwischen dem zu bestimmenden Dioxybenzol und dem Reagens soll etwa 1:100 betragen; eine geringere Konzentration an Reagens hat sich als weniger günstig erwiesen; eine höhere Konzentration verursacht, abgesehen von der bald erreichten Löslichkeitsgrenze, Eigenfärbung des Leerversuchs.

Die Ausführungs vorschrift der kolorimetrischen Bestimmung von Dioxybenzolderivaten mit unserem Reagens lautet somit unter Berücksichtigung der von uns erhobenen Befunde:

Die zu untersuchende Lösung soll maximal 5  $\gamma/cm^3$  Dioxybenzol enthalten. Pyridin- und Chinolinderivate sowie aromatische Diamine müssen, wenn vorhanden, entfernt werden. Die Lösung soll auf  $p_H$  2—3 eingestellt sein.

10  $cm^3$  der zu untersuchenden Lösung von  $p_H$  2—3 werden in einem Reagensglas von 2,5 cm äusserem Durchmesser mit eingeschliffenem Stöpsel mit 2  $cm^3$  einer 0,1-proz. frisch bereiteten Lösung von  $\beta$ -naphthalinsulfosaurem 4-Nitro-2-chlor-1-diazo-benzol von gleichem  $p_H$  versetzt und 60 Minuten in ein Wasserbad von 35 $^\circ$

gebracht.  $12 \text{ cm}^3$  Reagenslösung von gleichem  $p_{\text{H}}$  dienen als Leerversuch.

Nach genau einer Stunde wird im *Zeiss'*schen Stufen-Photometer oder in einem lichtelektrischen Photometer, z. B. dem Lumetron- oder dem Weka-Photometer kolorimetriert; im ersten Fall mit Filter S 43, im zweiten Fall mit dem Blue Filter 420, im dritten mit dem *Schott*-Filter GB 12, jedenfalls mit einem BlauviolettfILTER von einem Durchlässigkeitsbereich von  $400-430 \text{ m}\mu$ . Als Küvetten eignen sich solche von 30 mm Schichtdicke; bei Dioxybenzolkonzentrationen von  $1-2,5 \gamma/\text{cm}^3$  genügt eine Schichtdicke von 20 mm, bei Konzentrationen zwischen 2,5 und  $5 \gamma/\text{cm}^3$  eine solche von 10 mm. Beim Lumetron-Photometer ist es zweckmäßig, die Pyrexröhren durch Küvetten zu ersetzen.

Die Auswertung der Messergebnisse erfolgt an Hand von Eichkurven.

### Experimenteller Teil.

In unseren Tabellen und Abbildungen verwenden wir die folgenden Bezeichnungen: Extinktion  $E = \log I_0/I_D$ .  $T_P$  kennzeichnet die abgelesenen Durchlässigkeitswerte beim *Pulfrich*-Photometer,  $T_L$  die entsprechenden Werte des Lumetron-Photometers, die Zahl in Klammern hinter den Ablesewerten die Schichtdicke ( $d$ ) der verwendeten Küvetten in cm. Die Extinktion ist immer bezogen auf 1 cm Schichtdicke.

#### a) Absorptionsspektren der Reaktionslösungen:

Die Absorptionsspektren der Reaktionslösungen der Dioxybenzole mit  $\beta$ -naphthalinsulfosaurem 4-Nitro-2-chlor-1-diazo-benzol ( $p_{\text{H}} 2, 35^\circ, 1$  Stunde) wurden von Fr. cand. rer. nat. *E. Lazarus*<sup>1)</sup> mittels einer vereinfachten Sektormethode im sichtbaren Spektralbereich visuell bestimmt. Das Spektrum der Adrenalinreaktionslösung wurde außerdem im physikalisch-chemischen Institut der Universität Zürich von Hrn. P.-D. Dr. *K. Wieland*<sup>2)</sup> sowohl im sichtbaren als auch im ultravioletten Spektralbereich mit der Sektormethode photographiert und photometrisch ausgewertet. Diese Kurve ist in Fig. 1 zur Darstellung gebracht. Sie stimmt mit der von uns visuell für Adrenalin im sichtbaren Spektralbereich gefundenen innerhalb der Fehlergrenze überein, obgleich die Adrenalinreaktionslösung unter dem Einfluss des Lichtes eine Veränderung erfährt und die Extinktion während der Belichtung etwas zunimmt.

Der Kurve der Fig. 1 ist zu entnehmen, dass das Absorptionsmaximum der Adrenalinreaktionslösung im ultravioletten Spektralbereich bei ca.  $260 \text{ m}\mu$  gelegen ist. Da die beiden anderen Dioxybenzole im sichtbaren Spektralbereich nach unserén Messungen eine ähnliche Lage ihrer Absorptionskurven aufweisen, kommen für ihre photometrische Bestimmung BlauviolettfILTER in Frage: für das *Zeiss'*sche Stufen-Photometer das Filter S 43, für das Lumetron-Photometer das Filter Blue 420 und für das Weka-Photometer von *Kauhausen* das *Schott*filter BG 12. Wir hoffen, durch Kombination einiger derzeit erhältlicher Farbgläser noch bessere Filter als die genannten zu finden.

#### b) Eichkurven:

Konzentrations-Durchlässigkeitsmessungen mit Dioxybenzolderivaten unter Verwendung des *Zeiss*-Stufen-Photometers ergaben die in Tabelle 1 und Fig. 2a dargestellten Werte für  $T$  (Filter S 43,  $p_{\text{H}} 1, 20^\circ, 1$  Stunde Reaktionsdauer), welche erkennen lassen,

<sup>1)</sup> *E. Lazarus*, Dissertation Fribourg, in Bearbeitung.

<sup>2)</sup> Herrn P.-D. Dr. *K. Wieland*, Vorstand des physikalisch-chemischen Institutes der Universität Zürich, danken wir auch an dieser Stelle für die Durchführung der Messungen.

Tabelle 1.

Konzentrations-Durchlässigkeitswerte der Reaktionslösungen mit  
drei Dioxybenzolderivaten.

(*Pulfrich*- bzw. Lumetron-Photometer, Filter S 43 bzw. Blue 420  
 $p_H$  1, 20°, 1 Stunde)

Brenzkatechin					Adrenalin					Dioxyphenylalanin				
$\gamma$ cm <sup>3</sup>	T <sub>P</sub>	E <sub>P</sub>	T <sub>L</sub> * <sup>*</sup>	E <sub>L</sub>	$\gamma$ cm <sup>3</sup>	T <sub>P</sub>	E <sub>P</sub>	T <sub>L</sub>	E <sub>L</sub>	$\gamma$ cm <sup>3</sup>	T <sub>P</sub>	E <sub>P</sub>	T <sub>L</sub> * <sup>*</sup>	E <sub>L</sub>
0,1	96(3)	0,006	92	0,012	3,0	53(2)	0,138	45	0,116	0,2	88(3)	0,019	82	0,028
0,3	88(3)	0,016	83	0,027	1,5	75(2)	0,062	65	0,062	0,4	68(3)	0,056	67	0,058
0,5	75(3)	0,042	77	0,038	4,5	42(2)	0,189	36	0,148	0,5	65(3)	0,062	62	0,069
1,5	50(3)	0,100	57,5	0,080	6,0	34,5(2)	0,230	29	0,179	0,6	62(3)	0,069	59	0,078
2,5	33(3)	0,161	43	0,122	7,5	28(2)	0,276	22,6	0,215	0,8	48(3)	0,106	54	0,089
3,5	62(1)	0,208	33,5	0,158	0,6	89(2)	0,026	82	0,029	1,2	33,5(3)	0,158	41	0,129
6,0	43(1)	0,367	20,5	0,229	1,2	71(3)	0,050	71	0,050	1,4	30(3)	0,174	33	0,160
1,0	69(3)	0,054	63	0,067	2,4	51(3)	0,097	54,5	0,088	1,5	27,5(3)	0,187	38	0,140
2,0	43(3)	0,123	46	0,112	3,6	50(2)	0,150	43,5	0,121	2,0	17,5(3)	0,252	27,5	0,187
3,0	30(3)	0,174	37	0,144	3,6	34(3)	0,156			2,5	11,5(3)	0,313	23	0,213
4,0	18,5(3)	0,244	28	0,184	4,8	40,5(2)	0,197			3,0	8(3)	0,366	18,5	0,244
5,0	50,5(3)	0,097	(28,5)	0,182	4,8	26(3)	0,195	34,5	0,154	3,5	6(3)	0,407	16,5	0,261
10,0	31(1)	0,509	11	0,320	1,8	69(2)	0,080	63	0,067	4,0	5(3)	0,430	15	0,275
0,2	92(3)	0,012	90	0,015	2,7	60(2)	0,111	50	0,100	4,5	3,5(3)	0,485	13,5	0,290
0,4	85(3)	0,024	82	0,029	3,6	54(2)	0,134	41	0,129	5,0	3(3)	0,508	12	0,307
0,6	77(3)	0,038	76	0,040	4,5	44,5(2)	0,176	36,5	0,146	1,0	34(3)	0,156	—	—
0,8	72(3)	0,048	71	0,050	5,4	38(2)	0,210	31	0,169					

\*) d = 30 mm.

dass das *Beer*'sche Gesetz bis zu Konzentrationen von 5  $\gamma/cm^3$  Brenzkatechin und Adrenalin und 2,50  $\gamma/cm^3$  Dioxyphenylalanin gilt. Analoge Messungen mit dem Lumetron-Photometer 400 A, wie sie in Tabelle 1 und Fig. 2 b zur Darstellung gebracht sind, zeigen deutliche Abweichungen, wahrscheinlich bedingt durch die für unseren Zweck nicht völlig ausreichende Selektivität des Filters Blue 420; denn auch mit dem Weka-Photometer von Kauhausen unter Vorschaltung von *Schott*-Filter BG 12 findet sich die durch das *Beer*'sche Gesetz geforderte Extinktion.

#### c) $p_H$ -Abhängigkeit der Reaktion:

Die Wasserstoffionenkonzentration beeinflusst die Empfindlichkeit der Reaktion. Aus den Werten der Tabelle 2 (Fig. 3), die für Adrenalin bei 35° und einer Stunde Reaktionsdauer mit dem Lumetron-Photometer ermittelt wurden, ergibt sich die Erhöhung der Farbstärke mit Abnahme der Wasserstoffionenkonzentration. Der sich aufdrängenden Forderung, die Reaktion in noch weniger saurem Milieu als  $p_H$  3 vor sich gehen zu lassen, kann nur teilweise entsprochen werden, da das  $\beta$ -naphthalinsulfosaure 4-Nitro-2-chlor-1-diazo-benzol, trotz seiner grossen Beständigkeit, in schwächer sauren Lösungen (von einem  $p_H$  über 3 an) sehr lichtempfindlich ist und sich, besonders in Gegenwart von violettem Licht, rasch zersetzt, so dass der Leerwert während der Messung ansteigt, was ein genaues Arbeiten verunmöglicht.

#### d) Temperaturabhängigkeit der Reaktion:

Am Beispiel der Adrenalinbestimmung bei  $p_H$  1 und einer Stunde Reaktionsdauer wurde mit dem *Pulfrich*-Photometer die Abhängigkeit der Reaktion von der Tempera-

tur ermittelt. Es ergaben sich die in Tabelle 3 zusammengestellten und in Fig. 4 kurvenmässig wiedergegebenen Werte, welche zeigen, dass die Farbstärke mit steigender Temperatur stark zunimmt und dass auch bei höheren Temperaturen das *Bier'sche Gesetz* erfüllt ist.

Tabelle 2.

Konzentrations-Durchlässigkeitswerte von Adrenalinreaktionslösungen  
bei verschiedenen  $p_H$ .  
(Lumetron-Photometer, Filter Blue 420,  $d = 30 \text{ mm}$ ,  $35^\circ$ , 1 Stunde)

$p_H = 0$		$p_H = 1$		$p_H = 2$		$p_H = 3$	
$\gamma_{\text{Adr.}}/\text{cm}^3$	$T_L$	$\gamma_{\text{Adr.}}/\text{cm}^3$	$T_L$	$\gamma_{\text{Adr.}}/\text{cm}^3$	$T_L$	$\gamma_{\text{Adr.}}/\text{cm}^3$	$T_L$
0,05	96	0,05	96	0,05	96	0,05	89
0,3	80	0,2	83	0,1	89	0,6	54
0,6	73	0,6	67	0,25	84	3,0	19,5
1,2	59	1,0	54	0,35	79	5,0	11,0
1,8	48,5	3,0	27	0,6	68	0,3	72
2,4	40	5,0	16	3,0	23		
5,0	23			5,0	13		
				4,0	16,5		
				1,0	53,0		
				5,0	14,0		

Tabelle 3.

Konzentrations-Durchlässigkeitswerte der Reaktionslösung  
mit Adrenalin bei verschiedenen Temperaturen.  
(Pulfrich-Photometer, Filter S 43,  $d = 20 \text{ mm}$ ,  $p_H 1$ , 1 Stunde)

Reaktionstemperatur $20^\circ$			Reaktionstemperatur $25^\circ$			Reaktionstemperatur $35^\circ$		
$\gamma_{\text{Adr.}}/\text{cm}^3$	$T_P$	E	$\gamma_{\text{Adr.}}/\text{cm}^3$	$T_P$	E	$\gamma_{\text{Adr.}}/\text{cm}^3$	$T_P$	E
1,5	75	0,062	0,9	77	0,057	0,6	75	0,062
4,5	42	0,188	1,8	62	0,104	0,8	67	0,087
6,0	34,5	0,231	2,7	52	0,142	2,0	43	0,183
7,5	28,0	0,276	3,6	45	0,173	4,0	23	0,319
3,6	50	0,150	4,5	37	0,216	5,0	18	0,372
0,6	89	0,025	5,4	33,5	0,237	0,6	75,5	0,064
1,8	69	0,080	6,3	26	0,292	1,0	64,5	0,194
2,7	60	0,111	5,0	33	0,241	3,0	32,5	0,244
3,6	54	0,134	4,0	40	0,199	3,0	34	0,234
4,5	44,5	0,176				0,4	83	0,040
5,4	38	0,210				4,0	24	0,310
						5,0	17,5	0,378

Bei Temperaturen von  $35$  und  $38^\circ$  und besonders bei einem  $p_H$ -Wert über 1 muss daher genau nach einer Stunde ( $\pm 3$  Minuten) abgelesen oder aber die Reaktionslösung in Eiswasser gestellt werden. In letzterem Fall bleibt die Farbintensität mindestens während 20 Minuten konstant.

An sich könnten Messungen auch bei höherer Temperatur als bei 35–38° vorgenommen werden. Ein Erhitzen über 40° hat jedoch zur Folge, dass einerseits der Leerwert der Reaktion stark erhöht, andererseits die Spezifität des Reagens auf Dioxybenzolderivate beeinträchtigt wird; denn die meisten Diazoniumsalze reagieren in mineralsaurem Medium auch mit Monoxybenzolen, bei Zimmertemperatur allerdings mit sehr geringer Reaktionsgeschwindigkeit, die aber bei höheren Temperaturen merklich beschleunigt werden kann; so fanden wir, dass bei 45° auch Tyrosin in einer Konzentration von 100 γ/cm<sup>3</sup> eine messbare Färbung gibt, was bei 35° noch nicht der Fall ist.

e) Einfluss der Reaktionsdauer:

Tabelle 4 gibt die Lumetron-Durchlässigkeitswerte für die Reaktion des β-naphthalinsulfosauren 4-Nitro-2-chlor-1-diazo-benzols mit Brenzkatechin, Adrenalin und Dioxyphenylalanin bei 20° und pH 1 in Abhängigkeit von der Reaktionsdauer. Aus der kurvenmässigen Darstellung in Fig. 5 ist ersichtlich, dass nach 1 Stunde die Zunahme der Farbintensität in jedem Fall nur mehr ca. 1% in 5 Minuten beträgt, die Reaktion im wesentlichen also als beendet gelten kann.

**Tabelle 4.**  
Abhängigkeit der Lichtdurchlässigkeit der Reaktionslösungen  
von der Reaktionsdauer.  
(20° und pH 1)

Brenzkatechin 5 γ/cm <sup>3</sup>		Adrenalin 5 γ/cm <sup>3</sup>		Dioxyphenylalanin 4 γ/cm <sup>3</sup>	
Ablesung nach	T <sub>L</sub>	Ablesung nach	T <sub>L</sub>	Ablesung nach	T <sub>L</sub>
5'	59	5'	70	5'	71
10'	51	10'	65	15'	43
15'	44	15'	56	20'	31
20'	39	20'	51	30'	24
25'	36	25'	48	35'	22
30'	33	30'	45	40'	19,5
35'	31,5	35'	42	45'	18
40'	30	40'	40	50'	17
45'	28	45'	38	55'	16,5
50'	26,5	50'	36	60'	15,5
55'	25	55'	34		
60'	24	60'	34		
		60'	33		
		110'	22		
		120'	21		
		180'	17		

Wenn die Ablesungen nach einer Stunde mit einem Zeitfehler von ± 3 Minuten vorgenommen werden, so sind auch bei höheren Temperaturen und niederen Wasserstoffionenkonzentrationen die dadurch entstehenden Fehler geringer als die sonstigen Fehlerquellen der Bestimmung.

Ein Vergleich der mit Adrenalin nach drei Stunden bei 20° erreichten Farbtiefe der Reaktionslösung mit der nach einer Stunde bei 35° gefundenen, welche der Tabelle 2 bzw. Fig. 3 entnommen werden kann, zeigt, dass beide nahezu gleich sind. Die Farbintensität, welche bei dem Temperatuoptimum von 35° nach einer Stunde erreicht ist, wird bei einer Temperatur von 20° erst nach drei Stunden erreicht.

## f) Einfluss der Konzentration des Diazoreagens:

Es bleibt noch die Frage zu erörtern, welcher Überschuss an Reagens im Vergleich zur Konzentration der Dioxybenzole notwendig ist. Nimmt man als optimal bestimmbar Mengen der Dioxybenzolderivate etwa  $2 \gamma/cm^3$ , so ist aus der Tabelle 5 am Beispiel der Adrenalinbestimmung ersichtlich, dass bei  $p_H 1$  und  $35^\circ$  ein etwa 100facher Überschuss an Reagens notwendig ist, während ein nur zehnfacher Überschuss die Reaktion für die Bestimmung von Mengen unter  $1 \gamma/cm^3$  unbrauchbar macht und äquimolare Mengen überhaupt keinen wesentlichen Unterschied zum Leerwert mehr erkennen lassen.

Durch Verwendung eines grösseren Überschusses als eines 100fachen zu grösserer Lichtabsorption der Reaktionslösung gelangen zu wollen, verbietet sich infolge der nicht ausreichenden Löslichkeit des Reagens, wie auch (z.B. bei Herstellung konzentrierter Reagenslösungen in Eisessig) infolge dann auftretender stärkerer Eigenfärbungen. Auch haben entsprechende Versuche gezeigt, dass bei einer Temperatur von  $35^\circ$  ein grösserer Überschuss an Reagens nur mehr eine geringe Verstärkung der Farbintensität bewirkt.

Tabelle 5.

Einfluss der Konzentration des Diazoreagens auf die Farbintensität (Lichtdurchlässigkeit).  
(Lumetron-Photometer, Filter Blue 420,  $p_H 1$ ,  $35^\circ$ , 1 Stunde)

Vorgelegte Menge Adrenalin in $\gamma/cm^3$	Konzentration an Reagens		
	100 mg% $T_L$	10 mg% $T_L$	1 mg% $T_L$
0,05	96	100	100
0,2	83	96	97
5,0	16	74	97

## Zusammenfassung.

Es wird eine kolorimetrische Bestimmungsmethode für Dioxybenzolderivate mit  $\beta$ -naphthalinsulfosaurem 4-Nitro-2-chlor-1-diazo-benzol (N.N.C.D.)-Reagens beschrieben.

Es wird über die Eigenschaften des Reagens, über die Empfindlichkeit, Spezifität und Milieuabhängigkeit seiner Reaktion mit einigen Dioxybenzolderivaten berichtet und — unter Berücksichtigung der erhobenen Befunde — eine Ausführungs vorschrift der Bestimmung dieser Dioxybenzole gegeben.

Physiologisch-chemisches Institut der Universität,  
Fribourg.