

Über die Brauchbarkeit der isomeren Aminonaphtholsulfosäuren für die kolorimetrische Phosphorbestimmung.

Von **Béla Vásárhelyi** (Debrecen).

(Aus dem Institut für angewandte medizinische Chemie der Universität Wien.)

(Eingelangt am 8. Juli 1929.)

Die kolorimetrischen Phosphorbestimmungen verwenden mit wenigen Ausnahmen die Reduktion der komplexen Phosphormolybdänsäure zu blau gefärbten Molybdänoxyden. Als Reduktionsmittel kommen, neben dem von DENIGÈS eingeführten Stannochlorid, in erster Linie organische Reduktionsmittel in Frage, die jedoch die Bedingung erfüllen müssen, mit überschüssiger Molybdänsäure nicht zu reagieren*). Den ersten brauchbaren Versuch in dieser Richtung bedeutete die Einführung des Hydrochinons durch BELL-DOISY¹⁾. Die Verwendung des Hydrochinons hat freilich eine Reihe von Nachteilen. Hier sind in erster Linie die langsame Entwicklung der Blaufärbung und eine gewisse Farbschwäche zu nennen, ferner die enorme Empfindlichkeit der Reaktion gegen schon geringe Schwankungen in der Azidität. Dazu kommt, daß die Anwesenheit einer Reihe von Substanzen die Reaktion störend beeinflussen. So in erster Linie Oxalat, ferner ein etwas größerer Gehalt an Chlorid und Sulfat, weiters schon geringe Mengen Nitrit, Eisen und Kieselsäure, alles Substanzen, deren Gegenwart im biologischen Material nicht immer auszuschließen ist. Diese Nachteile veranlaßten FISKE und SUBBAROW²⁾, eine Reihe von anderen Substanzen auf ihre Brauchbarkeit für die kolorimetrische Phosphorbestimmung zu untersuchen, und zwar wurde von ihnen neben dem Hydrochinon das Monochlorhydrochinon, das 2,5-Dichlorhydrochinon mit wenig ermutigendem Erfolg geprüft. Auch die Aminophenole, wie das 2-Chlor-4-Aminophenol, 2,4-Diaminophenol, p-Methylaminophenol, 2-Chlor-4-Aminophenol, sowie das 5-Aminosaligenin ergaben keine wesentlichen Vorteile gegenüber dem Hydrochinon. Dagegen

*) Bezüglich der theoretischen Grundlagen dieser elektiven Reduktion des Phosphormolybdänkomplexes vergleiche die Arbeiten von FEIGL (Zeitschr. f. anal. Chem. 64 und 74). Über die Konstitution der blauen Molybdänoxyde siehe die Untersuchungen von HSEIN WU (Journ. of biol. Chem. 43, 189, 1920).

¹⁾ BELL-DOISY: Journ. of biol. Chem. 44, 55, 1920.

²⁾ FISKE-SUBBAROW: *ibid.*, 66, 375, 1925.

konnten in zwei isomeren Aminonaphtholsulfosäuren, und zwar in der 1,2,6- und 1,2,4-Aminonaphtholsulfosäure, zwei Substanzen aufgefunden werden, welche die Nachteile des Hydrochinons vermischen ließen und neben einer wesentlich rascheren Entwicklung auch zu einer intensiveren Färbung führen. Mit Rücksicht auf die leichtere Zugänglichkeit entschlossen sich FISKE und SUBBAROW zur methodischen Einführung der 1,2,4-Säure, die sowohl nach den Vorschriften von FOLIN³⁾ präparativ leicht zugänglich ist und auch als technisches Präparat im Handel erhältlich ist. Wenn man die Liste der bisher zur Untersuchung gelangten organischen Substanzen überblickt, so zeigt sich, daß sämtliche, einschließlich des von TSCHOPP⁴⁾ vorgeschlagenen Rodinals (p-Aminophenol), Entwicklercharakter zeigen und dadurch ausgezeichnet sind, daß sie oxydativ leicht in Chinone übergehen können. Dabei scheint, wie aus den Untersuchungen von FISKE und SUBBAROW an den chloresubstituierten Hydrochinonen hervorgeht, die Substitution im Benzolkern unter Umständen die Reaktion ungünstig zu beeinflussen.

Bestehen nun wirklich Beziehungen zwischen Konstitution dieser der Chinonbildung fähigen Reduktionsmittel und ihrer Einwirkung auf den Phosphormolybdänkomplex? Zur vorläufigen Entscheidung dieser Frage wurden auf Veranlassung von Professor H. K. BARRENSCHEEN zunächst eine Reihe isomerer Aminonaphtholsulfosäuren und Aminonaphtholdisulfosäuren untersucht. Theoretisch konnte hier sowohl die Stellung der NH₂- zur OH-Gruppe als auch die Stellung der SO₃H-Gruppe zur NH₂-Gruppe von Bedeutung sein. Die Untersuchungen wurden an folgenden Aminonaphtholsulfosäuren durchgeführt:

1,2,4-Aminonaphtholsulfosäure	
1,8,4-	„
2,3,6-	„
2,8,6-	„ (G-Säure).

Von Aminonaphtholdisulfosäuren kamen die

1,8,2,4-Aminonaphtholdisulfosäure	
1,8,3,6-	„
1,8,4,6-	„ (K-Säure)
2,8,3,6-	„

³⁾ FOLIN: *ibid.* 51, 377, 1922.

⁴⁾ TSCHOPP: *Biochem. Zeitschr.* 203, 267, 1928.

zur Untersuchung. Die theoretischen Möglichkeiten zur Chinonbildung sind bei den geprüften Substanzen recht mannigfaltig. Neben der Entstehung von Naphthochinonimiden ist die Möglichkeit von Ortho-, Para- und Amphinaphthochinonen vorhanden. Ebenso wäre eine Bildung von Dinaphthyldichinonen in Erwägung zu ziehen. Welche der gegebenen Möglichkeiten sich im Einzelfalle realisiert, läßt sich nicht sagen. Diesbezügliche Untersuchungen konnten in der Literatur nicht aufgefunden werden.

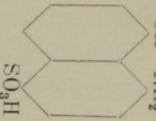
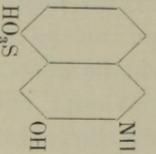
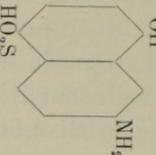
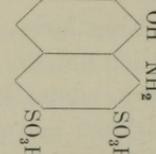
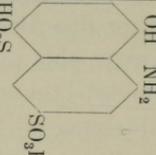
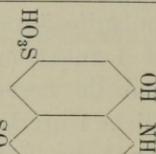
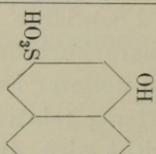
Sämtliche Säuren, welche als technische Präparate vorlagen, wurden entweder, wie die wasserlöslichen Disulfosäuren, durch Umkristallisieren aus Wasser oder, nach dem Vorgang von FISKE und SUBBAROW, aus ihrer Lösung in Bisulfit-Sulfit durch Umfällen mit Salzsäure gereinigt, mit Alkohol gewaschen und getrocknet. Für die Prüfung auf ihr Verhalten gegen den Phosphormolybdänkomplex kamen sie in einer der FISKE-SUBBAROW'schen Lösung der 1,2,4-Aminonaphtholsulfosäure entsprechenden Form — 0,25% ige Lösung in Bisulfit-Sulfit — zur Anwendung. Die Lösungen der 1,8,2,4- und 1,8,3,6-Disulfosäure zeigten eine etwas stärkere gelbliche Eigenfarbe, die übrigen wichen in ihrem Aussehen nicht wesentlich von der 1,2,4-Aminonaphtholsulfosäure ab.

Keine der in Verwendung kommenden Säuren zeigte auch bei einstündiger Einwirkung sowohl bei Zimmertemperatur als auch bei 37° eine Reduktionswirkung auf Molybdänsäure, dagegen ergaben sämtliche unter den Bedingungen der Phosphorbestimmung nach FISKE-SUBBAROW eine mehr weniger ausgesprochene Reduktion des Phosphormolybdänkomplexes zu blauen Molybdänoxyden. Die erhaltene Blaufärbung ist bei sämtlichen proportional der vorhandenen Phosphorsäure. Unter Zugrundelegung der mit der 1,2,4-Aminonaphtholsulfosäure erhaltenen Färbung ergaben sich folgende in Tabelle 1 zusammengestellte Ergebnisse:

Wie aus der Tabelle hervorgeht, zeigen sich gegenüber der 1,2,4-Säure wesentliche Unterschiede. Am auffälligsten ist zunächst der langsame Eintritt der Farbentwicklung, am stärksten ausgesprochen bei der 1,8,4-Säure und der 2,8,3,6-Disulfosäure, bei welchen vergleichbare Farbtöne erst nach 25 bis 40 Minuten erhalten wurden. Ein weiterer Unterschied ergibt sich darin, daß das Maximum der Färbung relativ spät, fast durchgehends erst nach einer Stunde, erreicht wird, dann aber, wie weitere, in die Tabelle nicht aufgenommene Kontrolluntersuchungen über drei Stunden hinaus ergaben, konstant bleibt. Einige der untersuchten Säuren

Tabelle I.

Standardlösung (1,2,4-Aminonaphtholsulfosäure) 0,4 mg. P. Standardeinstellung: 20 mm.
 Ablebung in mm. Temperatur: 37° C.

Zeit der Ablebung in Minuten	Aminonaphtholsulfosäure				Aminonaphtholsulfosäure			
	1,8,4	2,3,6	2,8,6	1,8,2,4	1,8,3,6	1,8,4,6	2,8,3,6	
5								.
10	.	.	21,1	.	.	24,2	.	
15	.	22,9	19,8	.	23,5	.	.	
20	.	20,0	19,5	24,3	22,3	22,0	.	
25	.	.	.	20,2	20,0	.	.	
30	21,2	.	19,2	18,4	18,7	19,9	.	
40	.	18,2	.	16,0	18,6	.	24,2	
50	19,9	.	19,2	.	.	19,7	22,6	
60	16,1	17,7	19,1	15,9	18,6	19,6	22,1	

zeigen einen wesentlich günstigeren Effekt wie die 1, 2, 4-Säure. Doch steht diesem Vorteil der Nachteil der langsameren Farbentwicklung entgegen.

Läßt sich nun die Wirkungsweise der untersuchten Säuren mit ihrer Konstitution irgendwie in Zusammenhang bringen? Es zeigt sich, daß offenbar den günstigsten Effekt jene Säuren zeigen, bei denen die NH_2 - und OH -Gruppe in Orthostellung zueinander stehen. Es gilt das für die von FISKE-SUBBAROW untersuchte 1,2,4- und 1,2,6-Säure, welche annähernd gleiche Wirksamkeit entfalten, ebenso wie für die hier untersuchte 2,3,6-Säure. Wesentlich ungünstiger liegen die Verhältnisse bei Stellung der NH_2 - zur OH -Gruppe in 1,8-Stellung. Die 2,8-Stellung läßt wieder eine relativ geringe Verzögerung erkennen, zeigt jedoch nicht diese maximale Farbentwicklung wie die übrigen untersuchten Säuren. Neben der gegenseitigen Stellung der NH_2 - und OH -Gruppen scheint auch die Stellung der Sulfogruppe zur Aminogruppe von ausschlaggebender Bedeutung zu sein. Es ist dies am deutlichsten bei den isomeren Disulfosäuren ersichtlich. Im allgemeinen läßt sich sagen, daß der Sulforest in Orthostellung zur Aminogruppe hemmend wirkt. Es ist naheliegend, daran zu denken, daß die Festlegung der NH_2 -Gruppe durch innere Salzbildung hierfür verantwortlich ist. Je größer die Entfernung des Sulforestes von der Aminogruppe, um so geringer die Verzögerung (siehe das Verhalten der 1,8,3,6- und 1,8,4,6-Disulfosäure). Dieser hemmende Einfluß der Stellung der SO_3H -Gruppe zeigt sich am klarsten beim Vergleich der 2,8,6-Säure mit der 2,8,3,6-Disulfosäure, welche von allen untersuchten die stärkste Verzögerung und den geringsten Endeffekt ergibt. Hinsichtlich der Brauchbarkeit für kolorimetrische Zwecke kommen wohl nur die 2,3,6- und 2,8,6-Säure in Frage, die am raschesten zu einer konstanten Färbung führen.

In einer weiteren Reihe von Untersuchungen wurde der Einfluß verschiedener Säurekonzentrationen sowie der Gegenwart solcher Stoffe untersucht, die bei biologischem Material vielfach vorkommen können. In erster Linie NaCl , NaNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NaNO_2 , Fe-Salze, Kieselsäure und Oxalat. Die Untersuchungen wurden sowohl bei Entwicklung der Färbung bei Zimmertemperatur als auch bei Einwirkung von 37° , wie sie von JENDRASSIK und LOHMANN⁵⁾ vorgeschlagen wurde, durchgeführt. Für die 1,2,4-Säure sind

⁵⁾ JENDRASSIK und LOHMANN: *ibid.* 178, 419, 1926.

Tabelle II.

Standardlösung : 0,4 mg P.
 Standardeinstellung : 20 mm.

Volumen : 100 cm³

H ₂ SO ₄ Conc.		0,5 N										0,6 N	0,3 N		
Zusatz	M.-NaCl	0,4 M NaNO ₃	KNO ₂		(NH ₄) ₂ SO ₄		FeCl ₃ %			K ₂ SiO ₃		20cm ³ 20%ige CCl ₃ COOH + Kalium- oxalat%			
			0,005 M	0,02 M	0,25 M	0,5 M	2 mg Fe	8 mg Fe	15mg Fe	Si:P- 50	Si:P- 200	30mg	60mg		
Temp.	Zeit in '	1,2,4-Aminonaphtholsulfosäure													
C 37°	5	20,1	20,0	20,0	20,2	20,0	20,1	20,1	20,0	20,1	19,8	17,7	20,0	20,0	
	10	20,1	20,0	20,0	20,2	20,0	20,1	20,0	20,1	20,2	17,0	10,2	20,0	20,0	
	15	20,0	20,2	20,2	20,2	20,1	20,0	20,0	20,1	20,2	15,1	8,4	19,9	20,0	
	20	20,0	20,2	20,2	20,2	20,1	20,0	20,0	20,1	20,2	15,1	8,4	19,9	20,0	
	30	20,0	20,7	20,8	20,3	20,3	21,0	20,1	20,2	20,5	13,4	7,7	20,0	19,9	
60	20,0	22,5	20,7	20,6	20,6	21,0	20,1	20,4	20,6	13,4	7,7	20,0	19,9		
C 21°	2	20,1	20,0	20,2	20,3	20,5	20,6	20,2	20,3	20,6	20,0	19,8	20,0	20,2	
	6	20,0	20,0	20,0	20,1	20,1	20,3	20,0	20,2	20,4	20,0	19,7	20,0	20,2	
	15	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,1	20,1	19,8	19,6	20,0	20,0	
1,8,4-Aminonaphtholsulfosäure															
C 37°	10	grün	23,1	grün	grün	grün	grün	23,4	grün	grün	20,0	.	17,9	.	
	20	grün	22,0	grün	grün	grün	28,1	grün	grün	19,6	.	18,1	.		
	40	24,2	20,8	23,2	21,7	22,1	23,6	20,0	19,3	19,9	15,1	.	18,0	.	
	60	23,1	20,9	21,4	21,2	21,8	23,8	20,1	19,5	19,3	10,7	.	.	.	
C 22°	20	19,8	.	20,6	.	
	30	19,9	.	21,2	.	
	60	19,9	.	21,3	.	
2,3,6-Aminonaphtholsulfosäure															
C 37°	10	22,4	20,1	grün	grün	25,7	grün	20,1	grün	grün	20,0	16,9	20,0	.	
	20	22,1	20,0	grün	grün	24,4	grün	20,0	grün	grün	18,1	14,2	19,8	.	
	40	19,9	20,1	23,5	24,8	21,3	23,2	19,9	21,1	grün	11,5	9,2	19,4	.	
	60	20,0	20,1	21,2	23,2	21,3	23,2	20,0	19,2	22,2	8,6	7,2	19,3	.	
C 22°	20	20,1	.	20,1	.	
	30	20,1	.	20,1	.	
	40	20,0	.	20,0	.	
	60	20,0	.	20,0	.	
2,8,6-Aminonaphtholsulfosäure															
C 37°	10	20,0	20,0	grün	grün	20,0	24,1	grün	grün	.	19,4	.	20,0	.	
	20	20,0	20,0	grün	grün	20,8	23,4	grün	grün	.	16,5	.	20,1	.	
	40	20,0	21,2	grün	grün	21,5	22,2	grün	grün	.	13,4	.	20,1	.	
	60	21,2	23,2	grün	grün	22,6	22,8	grün	grün	.	9,9	.	20,0	.	
C 22°	10	19,9	.	20,0	.	
	20	19,8	.	20,0	.	
	40	19,8	.	20,0	.	
	60	19,7	.	20,0	.	

Tabelle II.

Standardlösung: 0,4 mg P.
Standardeinstellung: 20 mm.Volumen: 100 cm³

H ₂ SO ₄ Conc.		0,5 N										0,6 N	0,3 N	
Zusatz	M.-NaCl	0,4 M NaNO ₃	KNO ₂		(NH ₄) ₂ SO ₄		FeCl ₃			K ₂ SiO ₃		20 cm ³ 20%ige CCl ₃ COOH + Kalium- oxalat		
			0,005 M	0,02 M	0,25 M	0,5 M	2 mg Fe	8 mg Fe	15mg Fe	Si:P- 50	Si:P- 200		30mg 60mg	
Temp.	Zeit in '	1,8,2,4-Aminonaphtholdisulfosäure												
C 37°	10	grün	20,1	braun	braun	grün	grün	12,7	grün	.	grün	.	24,2	.
	20	"	20,1	"	"	29,1	"	13,6	"	.	"	.	24,2	.
	40	22,1	20,1	"	"	22,0	"	20,3	20,1	.	20,1	.	24,0	.
	60	21,4	21,0	"	"	21,1	24,1	20,2	20,2	.	20,2	.	24,0	.
C 22°	20	20,0	.	23,4	.
	40	19,8	.	23,7	.
	60	19,6	.	24,3	.
1,8,3,6-Aminonaphtholdisulfosäure														
C 37°	10	grün	21,2	grün	grün	21,4	grün	22,8	grün	.	19,3	.	24,2	.
	20	.	22,2	"	"	21,6	"	22,4	"	.	17,5	.	20,3	.
	40	24,5	22,2	"	"	21,5	"	20,0	"	.	17,0	.	20,1	.
	60	22,9	23,4	23,2	23,2	21,6	26,6	19,6	17,4	.	13,4	.	20,0	.
C 22°	20	19,4	.	24,3	.
	40	18,6	.	21,9	.
	60	18,5	.	21,2	.
1,8,4,6-Aminonaphtholdisulfosäure														
C 37°	10	20,0	20,1	22,3	20,0	20,0	19,8	19,9	grün	.	18,9	.	22,5	.
	20	20,0	20,1	22,4	20,0	20,0	19,8	20,1	25,3	.	16,0	.	22,4	.
	40	20,0	21,6	22,4	21,8	20,0	20,0	20,1	20,1	.	14,5	.	22,2	.
	60	20,1	22,1	22,3	22,2	20,0	20,2	20,0	20,1	.	11,6	.	20,5	.
C 22°	10	19,9	.	27,1	.
	20	19,8	.	25,7	.
	40	19,8	.	25,1	.
	60	19,8	.	25,0	.
2,8,3,6-Aminonaphtholdisulfosäure														
C 37°	10	23,8	20,1	18,7	15,2	22,2	25,0	gelb	gelb	.	20,1	.	20,1	.
	20	20,1	20,1	18,6	15,2	20,2	23,1	"	"	.	17,2	.	20,0	.
	40	20,1	20,1	18,6	15,4	20,2	23,1	"	"	.	15,6	.	20,0	.
	60	20,0	20,1	19,2	gelb	20,2	22,7	"	"	.	14,7	.	20,0	.
C 22°	10	27,5	20,2	18,2	10,3	23,3	32,3	gelb	gelb	.	20,1	.	20,3	.
	15	27,3	20,2	19,1	14,2	23,2	32,1	"	"	.	20,1	.	21,6	.

derartige Versuche bei Zimmertemperatur von FISKE-SUBBAROW bereits veröffentlicht worden mit dem Ergebnis, daß die Reaktion weitgehend von der Azidität unabhängig ist und auch durch relativ hohe Konzentrationen der angeführten Stoffe nicht wesentlich beeinträchtigt wird. Eine Nachprüfung dieser Angaben zeigte ihre vollkommene Richtigkeit, ergab jedoch, daß bei Entwicklung der Farbe bei 37° nach JENDRASSIK und LOHMANN ein größerer Gehalt von Kieselsäure sich störend geltend macht und wesentlich zu hohe Werte ergibt. Ungünstiger liegen die Verhältnisse bei den isomeren Sulfo- und Disulfosäuren, welche durch höhere Konzentrationen von fast sämtlichen der angeführten Stoffe deutlich gestört werden. Diese Störung kann in manchen Fällen eine Ablesung unmöglich machen. Der Raumersparnis halber soll auf ein detailliertes Eingehen auf diese Verhältnisse verzichtet werden. Die Ergebnisse dieser Untersuchungsreihe sind in Tabelle II zusammengestellt. Der Vergleich wurde derart durchgeführt, daß eine mit der entsprechenden Sulfo- säure in üblicher Weise bereitete Standardlösung, entsprechend 0,4 mg P, bei einer Standardeinstellung von 20 mm gegen die jeweils gleichzeitig mit den angeführten Zusätzen angesetzten Lösungen von gleichem P-Gehalt verglichen wurde. Die Ablesungen erfolgten in Abständen von zehn zu zehn Minuten bis zu einer Stunde. Am günstigsten erwies sich hier die 2,3,6-Sulfosäure, die auch wegen der relativen Raschheit der Farbentwicklung als Ersatz der 1,2,4-Säure in Betracht kommen könnte.

Zusammenfassung.

Die isomeren Aminonaphtholsulfosäuren und Aminonaphtholdisulfosäuren, und zwar 1,8,4-, 2,3,6- und 2,8,6-Aminonaphtholsulfosäure, und 1,8,2,4-, 1,8,3,6-, 1,8,4,6- und 2,8,3,6-Aminonaphtholdisulfosäure, wirken unter Bildung blaugefärbter Molybdänoxyde spezifisch auf den Phosphormolybdänkomplex ein. Gegenüber der von FISKE-SUBBAROW eingeführten 1,2,4-Sulfosäure zeigen sie jedoch ein wesentlich verzögertes Eintreten der maximalen Farbintensität, ein Nachteil, dem für einige eine beträchtliche Farbvertiefung entgegensteht. Eine genauere Betrachtung zeigt, daß für die Raschheit der Farbentwicklung die Stellung der SO_3H -Gruppe zur NH_2 -Gruppe ausschlaggebend ist. Weniger

ausgesprochen erscheint die Abhängigkeit von der Stellung der NH_2 - zur OH-Gruppe.

Gegenüber der 1,2,4-Aminonaphtholsulfosäure ergibt sich für die untersuchten Säuren, daß die Reduktion durch höhere Konzentrationen von NaCl , NaNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sowie durch die Gegenwart von Nitrit, Eisen und Oxalat deutlich gehemmt wird. Für die 1,2,4-Säure konnte gezeigt werden, daß nach dem Vorgehen von JENDRASSIK und LOHMANN Kieselsäure stört, was bei Untersuchungen an biologischem Material eventuell zu berücksichtigen ist.
