

# p-Nitrophenol

<b>Methodennummer</b>	1
<b>Anwendbarkeit</b>	Bestimmung im Harn
<b>Analyt. Meßprinzip</b>	Photometrie
<b>Methodenklasse</b>	Analyse in biologischem Material
<b>Freigabe</b>	21. 5. 75

N

## Grundlage des Verfahrens

Säurehydrolyse der p-Nitrophenol-Konjugate im Urin, Extraktion in ein Lösungsmittelgemisch, Reextraktion in 2 n NH<sub>4</sub>OH, Aufnahme des Spektrums der Blaufärbung nach Reduktion und Indophenolblau-Reaktion mit o-Kresol, möglichst im Bereich von 800 bis 400 nm, Extinktionsmaximum 620 nm [1]. Für Konzentrationen zwischen 0,4–10,0 µg p-Nitrophenol pro ml Urin ist die Eichkurve linear.

Der reziproke Eichfaktor für die in Zusatzversuchen mit Urin erstellte Eichkurve beträgt 8,772 µg/ml Urin (Schichtdicke 10 mm).

Nachweisgrenze: 0,4 µg/ml Harn

Präzision: Standardabweichung (rel)  $s = \pm 1,6\%$   
Streubereich  $u = \pm 3,2\%$

Richtigkeit: 89,3%

## 1. Geräte, Chemikalien und Lösungen

### a) Geräte

selbstregistrierendes Spektrophotometer mit Meßmöglichkeit im sichtbaren Bereich

Zentrifuge, 3000 g  
Wasserbad  
10-mm-Küvetten  
50-ml-Schliffkolben mit Stopfen

100-ml-Scheidetrichter  
Pipetten  
Reagenzgläser  
Zentrifugengläser

#### b) Chemikalien

Isoamylalkohol reinst  
Petroläther zur Vergällung  
Äther, DAB 6  
15%ige wäßrige Titan(III)-chloridlösung (dunkel und kühl aufbewahren)  
*o*-Kresol reinst  
*p*-Nitrophenol p. a.  
konz. Ammoniaklösung (~ 25%ig) p. a.  
konz. Salzsäure D = 1,19

#### c) Lösungen

Extraktionsmittel: 1%ige Lösung von Isoamylalkohol in einer Mischung von 4 Volumina Petroläther mit 1 Volumen Äther

TiCl<sub>3</sub>-Lösung: 1 ml 15% TiCl<sub>3</sub>-Lösung + 8 ml dest. Wasser; stets frisch anzusetzen!

kalt gesättigte, wäßrige *o*-Kresol-Lösung

2 n NH<sub>4</sub>OH: 15 ml konz. NH<sub>4</sub>OH (~ 25%ig p. a.) mit dest. Wasser auf 100 ml auffüllen

## 2. Probenahme

möglichst 24-h-Harn

## 3. Analytische Bestimmung

5,0 ml Harn werden in einen 50-ml-Schliffkolben pipettiert und nach Zusatz von 5,0 ml Wasser und 2,0 ml konz. HCl im kochenden Wasserbad 1 h hydrolysiert. Der Schliffstopfen muß fest mittels einer Klammer o. ä. gesichert werden. Nach dem Abkühlen wird mit 25,0 ml des Extraktionsmittels 10 min unter kräftigem Schütteln extrahiert. Nach kurzem Abzentrifugieren schüttet man 20,0 ml der (obenliegenden) Extraktionsmittelschicht ab und schüttelt sie in einem 100 ml fassenden Scheidetrichter mit 5,0 ml 2 n NH<sub>4</sub>OH 2 min aus. Bei Konzentrationen > 10 µg/ml Urin muß der Extraktionsvorgang sofort mit je 5,0 ml 2 n NH<sub>4</sub>OH wiederholt werden, bis die letzte wäßrige Phase farblos ist. Die wäßrig-ammoniakalischen Phasen werden vereint. (Bei mehrmaliger Extraktion ist die Gesamt-

menge des zur Extraktion verwendeten 2 n  $\text{NH}_4\text{OH}$  zu berücksichtigen.) Man setzt zu 4,0 ml des Ammoniakextraktes 0,5 ml der wäßrigen *o*-Kresol-Lösung und 0,5 ml der frisch verdünnten  $\text{TiCl}_3$ -Lösung zu. (Es ist unbedingt erforderlich, die verdünnte  $\text{TiCl}_3$ -Lösung stets frisch anzusetzen.) Nun schüttelt man kräftig bis zur Farblosigkeit der Lösung und zentrifugiert das ausgefallene Titanhydroxid ab. Nach genau 30 min nimmt man das Spektrum zwischen 800 nm und 400 nm (Extinktionsmaximum 620 nm) in einer 10-mm-Küvette gegen 2 n  $\text{NH}_4\text{OH}$  in der Vergleichsküvette auf. (Bei Aufarbeitung von 5 ml *p*-Nitrophenol-freiem Harn in der beschriebenen Weise ergibt sich bei 620 nm eine Extinktion von 0,01–0,02, die vernachlässigt werden kann.) Die Zeit von 30 min muß eingehalten werden, da in kürzeren Zeiträumen der Indophenol-farbstoff noch nicht voll ausgebildet und nach einem längeren Zeitraum bereits wieder zersetzt ist. Sollte die Extinktion außerhalb des Meßbereichs liegen, ist eine definierte Verdünnung mit 2 n  $\text{NH}_4\text{OH}$  möglich. (Das Lambert-Beersche Gesetz ist anwendbar.)

N

#### 4. Berechnung des Analysenergebnisses

Im Bereich von 0,4–10,0  $\mu\text{g}$  *p*-Nitrophenol/ml Urin ist die Eichfunktion  $M = f_e(X^*)$  bei  $\Delta M = \Delta E$  linear.<sup>\*)</sup> Bei einer Schichtdicke von 10 mm beträgt der reziproke Eichfaktor für die mit Urin erstellte Eichkurve

$$k' = \frac{X^*}{\Delta E} = 8,772 \mu\text{g/ml Harn}$$

Hierbei ist  $E$  die Extinktion bei 620 nm.

Die *p*-Nitrophenol-Konzentration in 1 ml Harn beträgt dann bei einmaliger Extraktion mit 2 n  $\text{NH}_4\text{OH}$ :

$$C = E_{620 \text{ nm}/10 \text{ mm}} \cdot 8,772 \mu\text{g/ml Harn}$$

Für mehrmalige Extraktion gilt:

$$C = E_{620 \text{ nm}/10 \text{ mm}} \cdot 8,772 \cdot A \mu\text{g/ml Harn}$$

Dabei ist  $A$  die Anzahl der Extraktionen.

<sup>\*)</sup> Vgl. Allgemeine Vorbemerkungen, S. 11.



# p-Nitrophenol

<b>Methodennummer</b>	1
<b>Anwendbarkeit</b>	Bestimmung im Harn
<b>Analyt. Meßprinzip</b>	Photometrie
<b>Methodenklasse</b>	Analyse in biologischem Material
<b>Freigabe</b>	21. 5. 75

**N**

---

## Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung
2. Geräte, Chemikalien und Lösungen
  - 2.1. Geräte
  - 2.2. Chemikalien
  - 2.3. Lösungen
3. Probenahme
4. Analytische Bestimmung
  - 4.1. Arbeitsweise
  - 4.2. Berechnung des Analysenergebnisses
5. Beurteilung des Verfahrens
  - 5.1. Präzision
  - 5.2. Richtigkeit
  - 5.3. Nachweisgrenze
  - 5.4. Störeinflüsse
6. Diskussion
7. Literatur

## 1. Zusammenfassung

Zur Bestimmung von *p*-Nitrophenol, das im Harn konjugiert ausgeschieden wird, wird eine von von Eicken [1] ausgearbeitete photometrische Methode angewendet. Nach saurer Hydrolyse wird *p*-Nitrophenol mit einer Mischung von Äther, Petroläther und Isoamylalkohol aus dem Harn extrahiert. Dem Extraktionsmittel wird das *p*-Nitrophenol mit 2 n Ammoniak entzogen und nach Reduktion mit Titantrichlorid das entstandene *p*-Aminophenol mit *o*-Kresol zum Indophenolblau umgesetzt.

Man nimmt das Spektrum des blauen Indophenolfarbstoffes zwischen 800 nm und 400 nm (Extinktionsmaximum 620 nm) in einer 10-mm-Küvette auf. Für Konzentrationen zwischen 0,4–10,0 µg *p*-Nitrophenol pro ml Urin ist die Eichfunktion linear.

Die *p*-Nitrophenolkonzentration in µg/ml Urin ergibt sich bei einmaliger Reextraktion mit 5 ml 2 n NH<sub>4</sub>OH aus dem Extraktionsmittel aus der gemessenen Extinktion (620 nm) · 8,772

Nachweisgrenze: 0,4 µg/ml Harn

Präzision: Standardabweichung (rel)  $s = \pm 1,6\%$   
Streubereich  $u = \pm 3,2\%$

Richtigkeit: 89,3%

## 2. Geräte, Chemikalien und Lösungen

### 2.1. Geräte

selbstregistrierendes Spektrophotometer mit Meßmöglichkeiten im sichtbaren Bereich

Zentrifuge, 3000 g

Wasserbad

10-mm-Küvetten

100-ml-Scheidetrichter

50-ml-Schliffkolben mit Stopfen

Pipetten

Reagenzgläser

Zentrifugengläser

### 2.2. Chemikalien

Isoamylalkohol reinst

Petroläther zur Vergällung

Äther, DAB 6

15%ige wäßrige Titan(III)-chloridlösung (dunkel und kühl aufbewahren)

*o*-Kresol reinst

*p*-Nitrophenol p. a.

konz. Ammoniaklösung (~ 25%ig) p. a.  
konz. Salzsäure  $D = 1,19$

### 2.3. Lösungen

Extraktionsmittel: 1%ige Lösung von Isoamylalkohol in einer Mischung von 4 Volumina Petroläther und 1 Volumen Äther

TiCl<sub>3</sub>-Lösung: 1 ml 15%ige wäßrige Titan(III)-chloridlösung + 8 ml dest. Wasser; stets frisch ansetzen! (Haltbarkeit höchstens 6 Stunden.)

kalt gesättigte, wäßrige *o*-Kresol-Lösung

2 n NH<sub>4</sub>OH: 15 ml konz. NH<sub>4</sub>OH (~ 25%ig p. a.) mit dest. Wasser auf 100 ml auffüllen.

### 3. Probenahme

möglichst 24-h-Harn

### 4. Analytische Bestimmung

#### 4.1. Arbeitsweise

5,0 ml Harn werden in einen 50-ml-Schliffkolben pipettiert und nach Zusatz von 5,0 ml Wasser und 2,0 ml konz. HCl im kochenden Wasserbad 1 h hydrolysiert. Der Schliffstopfen muß fest mittels einer Klammer o. ä. gesichert werden. Nach dem Abkühlen wird mit 25,0 ml des Extraktionsmittels 10 min unter kräftigem Schütteln extrahiert. Nach kurzem Abzentrifugieren pipettiert man 20,0 ml der (obenliegenden) Extraktionsmittelschicht ab und schüttelt sie in einem 100 ml fassenden Scheidetrichter mit 5,0 ml 2 n NH<sub>4</sub>OH 2 min aus. Bei Konzentrationen > 10 µg/ml Urin muß der Extraktionsvorgang sooft mit je 5,0 ml 2 n NH<sub>4</sub>OH wiederholt werden, bis die letzte wäßrige Phase farblos ist. Die wäßrig-ammoniakalischen Phasen werden vereint. (Bei mehrmaliger Extraktion ist die Gesamtmenge des zur Extraktion verwendeten 2 n NH<sub>4</sub>OH zu berücksichtigen.)

Man setzt zu 4,0 ml des Ammoniakextraktes 0,5 ml der wäßrigen *o*-Kresol-Lösung und 0,5 ml der frisch verdünnten TiCl<sub>3</sub>-Lösung zu. (Es ist unbedingt erforderlich, die verdünnte TiCl<sub>3</sub>-Lösung stets frisch anzusetzen.) Nun schüttelt man kräftig bis zur Farblosigkeit der Lösung und zentrifugiert das ausgefallene Titanhydroxid ab. Nach genau 30 min nimmt man das Spektrum zwischen 800 nm und 400 nm (Extinktionsmaximum 620 nm) in einer 10-mm-Küvette gegen 2 n NH<sub>4</sub>OH in der Vergleichsküvette auf. (Bei Aufarbeitung von 5 ml

N

*p*-Nitrophenol-freiem Harn in der beschriebenen Weise ergibt sich bei 620 nm eine Extinktion von 0,01–0,02, die vernachlässigt werden kann.) Die Zeit von 30 min muß eingehalten werden, da in kürzeren Zeiträumen der Indophenol-farbstoff noch nicht voll ausgebildet und nach einem längeren Zeitraum bereits wieder zersetzt ist. Sollte die Extinktion außerhalb des Meßbereiches liegen, ist eine definierte Verdünnung mit 2 n NH<sub>4</sub>OH möglich. (Das Lambert-Beersche Gesetz ist anwendbar.)

#### 4.2. Berechnung des Analyseergebnisses

Im Bereich von 0,4–10,0 µg *p*-Nitrophenol/ml Urin ist die Eichfunktion  $M = f_e(X^*)$  bei  $\Delta M = \Delta E$  linear<sup>†</sup>. Bei einer Schichtdicke von 10 mm beträgt der reziproke Eichfaktor für die mit Urin erstellte Eichkurve

$$k' = \frac{X^*}{\Delta E} = 8,772 \text{ µg/ml Harn}$$

Hierbei ist *E* die Extinktion bei 620 nm.

Die *p*-Nitrophenol-Konzentration in 1 ml Harn beträgt dann bei einmaliger Extraktion mit 2 n NH<sub>4</sub>OH

$$c = E_{620 \text{ nm}/10 \text{ mm}} \cdot 8,772 \text{ µg/ml Harn}$$

Für mehrmalige Extraktion gilt:

$$c = E_{620 \text{ nm}/10 \text{ mm}} \cdot 8,772 \cdot A \text{ µg/ml Harn}$$

Dabei ist *A* die Anzahl der Extraktionen mit 2 n NH<sub>4</sub>OH.

### 5. Beurteilung des Verfahrens

#### 5.1. Präzision

Aus 16 Einzelbestimmungen (dabei wurde jeweils 5,0 ml Harn einer Person nach E-605-Aufnahme verwendet) wurde eine relative Standardabweichung von  $s = \pm 1,6\%$  bei 5,7 µg *p*-Nitrophenol/ml Harn bestimmt. Streubereich  $u = \pm 3,2\%$ .

---

<sup>†</sup> Vgl. Allgemeine Vorbemerkung, S. 11.



## 5.2. Richtigkeit

Es steht kein reines *p*-Nitrophenolglucuronid oder -sulfat zur Verfügung, weshalb hiermit keine Konzentrationsreihen aufgestellt werden konnten. Deshalb wurde zu *p*-Nitrophenol-haltigem Urin im Zusatzverfahren *p*-Nitrophenol zugesetzt und in mehreren Konzentrationsbereichen die Wiederfindung bestimmt. Zwischen Zusatz und Durchführung der Analyse lagen dabei ca. 10 min. Es wurde eine mittlere Wiederfindungsrate von 89,3% erreicht. Im einzelnen ergaben sich die folgenden Werte, wobei zu betonen ist, daß das gesamte Verfahren in die Prüfung einbezogen wurde:

$\mu\text{g } p\text{-Nitrophenol}$ ml Urin	Zugabe $\mu\text{g}$ <i>p</i> -Nitro- phenol/ml	davon wieder- gefunden $\mu\text{g/ml}$	Wieder- findungs- rate %
1,8	1,0	0,96	96,0
	2,0	1,80	90,0
	3,0	2,64	88,0
3,7	3,0	2,58	86,0
	4,0	3,30	82,5
	6,0	5,58	93,0

$$\bar{M} = \frac{\Sigma M (\%)}{n} = 89,3\%$$

## 5.3. Nachweisgrenze

Unter den angegebenen Analysenbedingungen beträgt die Nachweisgrenze 0,4  $\mu\text{g } p\text{-Nitrophenol/ml}$  Harn. Der Harn-Leerwert schwankt um  $E = 0,01 - 0,02$ .

## 5.4. Störeinflüsse

*p*-Nitrophenol findet sich normalerweise nicht im menschlichen Harn. Zu beachten ist, daß zu einem Indophenolfarbstoff reagierende *p*-Nitrophenole als Stoffwechselprodukte einiger toxischer Verbindungen in den Harn gelangen können.

Auch von vielen anderen *p*-Nitrophenolderivaten ist eine positive Indophenolblaureaktion unter den Bedingungen nach [1] zu erwarten. Wir konnten dies bei Einsatz von etwa 2  $\mu\text{g}$  der folgenden Verbindungen in 5 ml verdünntem  $\text{NH}_4\text{OH}$  an Stelle von 5 ml Urin bestätigen:

2-Chlor-4-nitrophenol  
 3-Chlor-4-nitrophenol

2,6-Dichlor-4-nitrophenol  
 3-Methyl-4-nitrophenol



Die Absorptionsmaxima der jeweiligen Indophenolfarbstoffe können unterschiedlich sein (Tab. 1).

**Tab. 1.** Absorptionsmaxima der Indophenolblaufarbstoffe verschiedener *p*-Nitrophenole unter den Bedingungen der Reaktion nach [1].

	$\lambda_{\text{max}}$ Indophenolblaufarbstoff (nm)
<i>p</i> -Nitrophenol	620
3-Methyl-4-nitrophenol	636
2-Chlor-4-nitrophenol	600
3-Chlor-4-nitrophenol	600
2,6-Dichlor-4-nitrophenol	583

2-Chlor-4-nitrophenol ist als Fungizid unter dem Namen „Nitrofungi“ im Handel. Es wird außerdem als Stoffwechselprodukt von *m*-Chlornitrobenzol und Dicaphton (Isochlorthion: 0,0-Dimethyl-O-(2-chlor-4-nitrophenyl)-thionophosphat) ausgeschieden. 3-Chlor-4-nitrophenol ist als Stoffwechselprodukt von Chlorthion (0,0-Dimethyl-O-(3-chlor-4-nitrophenyl)-thionophosphat) und *o*-Chlor-nitrobenzol im Harn zu erwarten, 3-Methyl-4-nitrophenol ist nach Aufnahme von Folithion (0,0-Dimethyl-O-(3-methyl-4-nitrophenyl)-thionophosphat) im Harn nachgewiesen worden. 2,6-Dichlor-4-nitrophenol wurde bei Kaninchen nach Gabe von 2,6-Dichlornitrobenzol im Harn gefunden.

Andere substituierte *p*-Nitrophenole lassen sich zwar mit gelber Farbe in 2 n NH<sub>4</sub>OH ausschütteln, liefern jedoch keinen Indophenolfarbstoff [6]. *p*-Aminophenol, z. B. nach Hydrolyse von Metaboliten bestimmter Analgetika (Anilinderivate) oder Nitrobenzol, stört die Reaktion nicht. Dagegen ergeben andere Metaboliten des Phenacetins mit *p*-Aminophenolfunktion eine positive Indophenolblau-Reaktion [7]. In einem solchen Fall ist aber die Ammoniakphase nicht gelb gefärbt. Elliot und Mitarbeiter [8] empfehlen weiter, darauf zu achten, ob bereits nach Zugabe des *o*-Kresols allein ohne Zusatz von Titantrichlorid eine Blaufärbung auftritt. Diese kann dann nicht von *p*-Nitrophenol herrühren und deutet auf die Anwesenheit von *p*-Aminophenolen hin. Für spätere Wiederholungen der Bestimmung sollte der Harn stets eingefroren werden.

## 6. Diskussion

Eine Bestimmung für geringere *p*-Nitrophenol-Konzentrationen mit einem ähnlichen Verfahren, jedoch unter Einschaltung eines Reinigungsschrittes, geben Elliot und Mitarbeiter [8] an. Eine Variante zur qualitativen Schnellbestimmung findet sich bei [9].

Das Absorptionsspektrum des Indophenol-Farbstoffs in 2 n NH<sub>4</sub>OH wurde zwischen 800 und 400 nm aufgenommen (Abb. 1, S. 8). Das Maximum liegt bei 620 nm.

Die Eichkurve (Abb. 2, S. 8) wurde durch Zusatz von *p*-Nitrophenol zu Urin erstellt, wobei die Hydrolyse, der Extraktionsvorgang und die Indophenolreaktion eingeschlossen waren. Beim Weglassen des einstündigen Kochens ergaben sich identische Werte. Dieses Ergebnis läßt sich zwanglos mit der Stabilität des *p*-Nitrophenol erklären, das beim Kochen unzersetzt erhalten bleibt.

Die in der Eichkurve angegebenen Konzentrationen beziehen sich auf µg *p*-Nitrophenol/ml Urin und 5 ml 2 n NH<sub>4</sub>OH als Reextraktionsmittel. Die Eichkurve ist zwischen 0,4–10,0 µg/ml Urin linear. Das Lambert-Beersche Gesetz ist anwendbar.

Das Analyseergebnis kann daher direkt mit Hilfe des reziproken Eichfaktors  $k'$  aus der gemessenen Extinktion unter Berücksichtigung der Anzahl der Extraktionen mit 2 n NH<sub>4</sub>OH bestimmt werden.

Messungen an verschiedenen Photometern ergaben reproduzierbare Abweichungen bis zu 10%, so daß wir empfehlen, für jedes Gerät eine eigene Eichkurve zu erstellen bzw. den Eichfaktor zu kontrollieren.

Die vorliegenden Messungen wurden mit einem Shimadzu Double-Beam Spectrophotometer UV 200 der Firma Shimadzu Seisakusho LTD, Kyoto, Japan, durchgeführt.

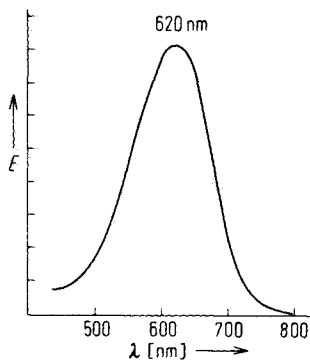
## 7. Literatur

- [1] S. v. Eicken, *Angew. Chem.* 66, 551 (1954).
- [2] J. D. Arterberry, W. F. Durham und J. W. Elliot, *Arch. Environm. Health* 3, 476 (1961).
- [3] C. C. Roan, D. P. Morgan, N. Cook und E. H. Paschal, *Bull. Environm. Cont. Toxicol.* 4, 362 (1969).
- [4] W. F. Durham, P. Fla, J. R. Wolfe und J. W. Elliot, *Arch. Environm. Health*, 24, 381 (1972).
- [5] F. E. Guthrie, N. C. Raleigh, W. B. Tappan, O. Fla und M. D. Jackson, *Arch. Environm. Health* 25, 32 (1972).
- [6] W. Pilz, *Microchim. Acta* 1958, 383.
- [7] H. Kaiser und Th. Haag, *Arch. Pharm.* 289/61, 542 (1956).
- [8] J. W. Elliot, K. C. Walker, A. E. Penick und W. F. Durham, *J. Agr. Food Chem.* 8, 111 (1960).
- [9] M. Geldmacher-von Mallinckrodt und K. Deinzer, *Z. Klin. Chem.* 4, 81 (1966).

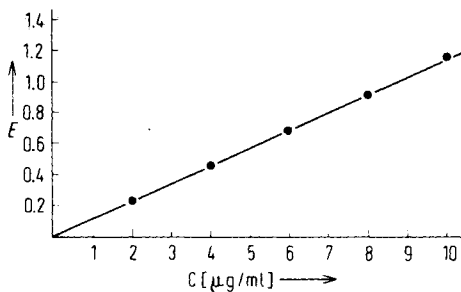
Autor: M. Geldmacher-von Mallinckrodt

Prüfer: A. Zober

N



**Abb. 1.** Absorptionsspektrum der Indophenolverbindung aus *p*-Nitrophenol in 2 n  $\text{NH}_4\text{OH}$ .



**Abb. 2.** Eichkurve für *p*-Nitrophenol nach Zusatz zu Urin bei 620 nm und 10 mm Schichtdicke.

Ordinate: Extinktion.  
Abszisse: Konzentration in  $\mu\text{g/ml}$  Urin (bei einmaliger Extraktion mit 5 ml 2 n  $\text{NH}_4\text{OH}$ ).