

p-Aminophenol

Methodennummer	1
Anwendbarkeit	Bestimmung in Harn
Analyt. Meßprinzip	Photometrie
Methodenklasse	Analyse in biologischem Material
Freigabe	6. 7. 1976

Grundlage des Verfahrens

Säurehydrolyse der p-Aminophenol-Konjugate im Urin, Reaktion in Gegenwart von Hypobromit mit Phenol unter Bildung eines blau-violetten Indophenolfarbstoffes; Extinktionsmaximum 634 nm.

Für Konzentrationen zwischen 20 und 450 µg p-Aminophenol pro ml Harn ist die Eichkurve linear.

Empfindlichkeit:	reziproker Eichfaktor $k' = 378 \text{ µg/ml Urin}$
Präzision:	Streubereich $u = 5,25$ entsprechend einer Standardabweichung $s_{\text{rel}} = 2,5\%$ bei $n = 20$ Bestimmungen
Richtigkeit:	Wiederfindungsrate $r = 92\%$ (geprüft mit N-Acetyl-p-aminophenol)
Nachweisgrenze:	$\underline{X}^* = 20 \text{ µg/ml Urin}$
Querempfindlichkeiten:	endogene aromatische Amine, andere Aminophenole

1. Geräte, Chemikalien und Lösungen

a) Geräte

(Selbstregistrierendes) Spektrophotometer mit Meßmöglichkeit bei $\lambda = 634 \text{ nm}$
Wasserbad

Analytische Methoden Band 2
Deutsche Forschungsgemeinschaft, Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe – Arbeitsgruppe „Analytische Chemie“

Graduierte Reagenzgläser mit Normschliff (10 ml Inhalt)

10 mm Küvetten

Pipetten

b) Chemikalien

6 N Salzsäure

0,2 N Natriumhydroxid

Phenol p. a.

Natriumcarbonat, wasserfrei p. a.

Brom

N-Acetyl-p-aminophenol

c) Lösungen

Bromwasser: gesättigte wäßrige Lösung

Natriumcarbonatlösung: 10 g Natriumcarbonat mit dest. Wasser zu 100 ml lösen.

Phenollösung: 1 g Phenol mit dest. Wasser zu 100 ml lösen.

Hypobromit-Lösung: 3 ml Bromwasser mit 20 ml 10%iger Natriumcarbonat-Lösung mischen. Frisch bereiten!

Reagenz: 8 Teile 0,2 N Natriumhydroxid, 1 Teil 1%ige Phenollösung und 1 Teil Hypobromit-Lösung mischen.

Unmittelbar vor dem Gebrauch herstellen!

d) Vergleichsstandard

Stammlösung:

100 mg N-Acetyl-p-aminophenol in 100 ml Wasser.

Durch entsprechende Verdünnungen werden daraus Eichlösungen von 50 bis 600 µg N-Acetyl-p-aminophenol /ml hergestellt.

1 µg N-Acetyl-p-aminophenol entspricht 0,725 µg p-Aminophenol.

2. Probenahme

Möglichst 24-h-Harn

3. Analytische Bestimmung

In ein graduiertes Reagenzglas werden nacheinander 0,5 ml Harn, 1,5 ml 6 N Salzsäure und 1 ml Wasser gegeben. Das Gemisch wird 30 min im kochenden Wasserbad hydrolysiert. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wird mit Wasser auf 5 ml

aufgefüllt und gemischt. 1 ml dieser Lösung wird in ein anderes graduiertes Reagenzglas gefüllt und mit 10 ml Reagenz versetzt. Mischen. Bei höheren Konzentrationen färbt sich die Lösung rasch blau. Messung nach 40 min bei 634 nm gegen einen gleich behandelten Blindansatz (0,5 ml aqua dest. statt Urin).

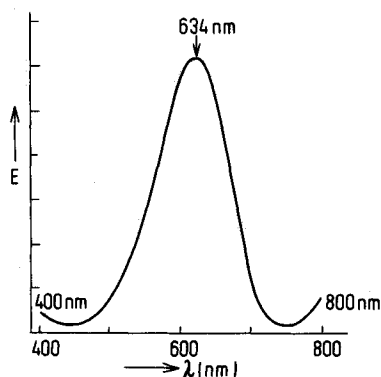


Abb. 1. Absorptionsspektrum der Indophenolverbindung aus *p*-Aminophenol.

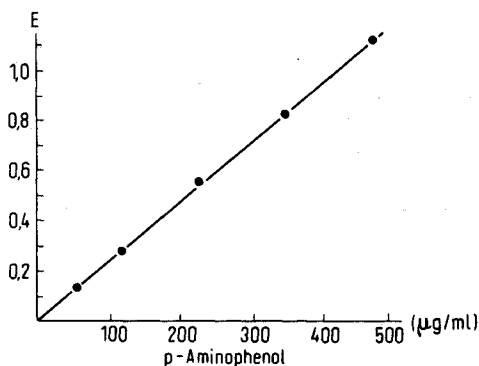


Abb. 2. Eichkurve für *p*-Aminophenol nach Zusatz von N-Acetyl-*p*-aminophenol zu Urin, bei 634 nm und 10 mm Schichtdicke. Ordinate: Extinktion, Abszisse: *p*-Aminophenol-Konzentration in µg/ml Urin.

4. Berechnung des Analysenergebnisses

Im Bereich von 20–450 µg *p*-Aminophenol/ml Urin ist die Eichfunktion $M = f_e(X^*)$ bei $\Delta M = \Delta E_{634\text{nm}/10\text{mm}}$ linear*).

* Vgl. Allg. Vorbemerkungen, S. 10.

Bei einer Schichtdicke von 10 mm beträgt der reziproke Eichfaktor für die mit N-Acetyl-p-aminophenol und Urin erstellte Eichkurve

$$k' = \frac{X^*}{\Delta E_{634 \text{ nm}/10 \text{ mm}}} = 378 \mu\text{g } p\text{-Aminophenol/ml Harn}$$

Hierbei ist $\Delta E = E - E_0$ die Extinktion bei 634 nm.

Die p-Aminophenol-Konzentration in 1 ml Harn beträgt dann

$$C = \Delta E_{634 \text{ nm}/10 \text{ mm}} \cdot 378 \mu\text{g/ml Harn}$$

p-Aminophenol

p-Aminophenol, $\text{C}_6\text{H}_7\text{ON}$



wird im Harn in konjugierter Form u. a. nach Aufnahme von

Anilin (MAK-Wert 1976 5 ppm; 19 mg/m^3)

p-Anisidin (MAK-Wert 1976 0,1 ppm; 0,5 mg/m^3)

Nitrobenzol (MAK-Wert 1976 1 ppm; 5 mg/m^3)

ausgeschieden.

Die quantitative Bestimmung im Urin ist nur nach Hydrolyse möglich. Sie kann einen wertvollen Hinweis für die Beurteilung einer Exposition mit den oben genannten Verbindungen geben.

Der größte Teil einer aufgenommenen Anilindosis wird innerhalb der folgenden 24 Stunden als p-Aminophenol konjugiert im Harn ausgeschieden [1,2].

Der Verdacht einer gefährlichen Exposition mit Anilin ist gegeben, wenn die p-Aminophenol-Ausscheidung 50 mg/l überschreitet [3].

Toxische Wirkung von Anilin auf den Menschen s. [2].

Über die p-Aminophenol-Ausscheidung im Urin nach Aufnahme von Nitrobenzol und p-Anisidin beim Menschen ist wenig bekannt.

p-Aminophenol

Methodennummer	1
Anwendbarkeit	Bestimmung in Harn
Analyt. Meßprinzip	Photometrie
Methodenklasse	Analyse in biologischem Material
Freigabe	6. 7. 1976

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung
2. Geräte, Chemikalien und Lösungen
 - 2.1. Geräte
 - 2.2. Chemikalien
 - 2.3. Lösungen
 - 2.4. Vergleichsstandard
3. Probenahme
4. Analytische Bestimmung
5. Berechnung des Analyseergebnisses
6. Beurteilung des Verfahrens
 - 6.1. Nachweisgrenze
 - 6.2. Präzision
 - 6.3. Richtigkeit
 - 6.4. Störeinflüsse
7. Diskussion der Methode
8. p-Aminophenol
9. Literatur

1. Zusammenfassung

Zur Bestimmung von p-Aminophenol, welches im Harn konjugiert ausgeschieden wird, wird eine von *Welch* und *Conney* [4] für N-Acetyl-p-aminophenol ausgearbeitete photometrische Methode angewendet. Nach saurer Hydrolyse wird das

p-Aminophenol mit Phenol in Gegenwart von Hypobromit zu einem Indophenolfarbstoff umgesetzt, wobei eine blau-violette Färbung entsteht.

Die Extinktion wird bei 634 nm gemessen. Für die Konzentration von 20 bis 450 µg p-Aminophenol pro ml ist die Eichfunktion linear.

Empfindlichkeit:	reziproker Eichfaktor $k' = 378 \mu\text{g/ml Urin}$
Präzision:	Streubereich $u = 5,25$ entsprechend einer Standardabweichung $s_{\text{rel}} = 2,5\%$ bei $n = 20$ Bestimmungen
Richtigkeit:	Wiederfindungsrate $r = 92\%$ (geprüft mit N-Acetyl-p-aminophenol)
Nachweisgrenze:	$\underline{X}^* = 20 \mu\text{g/ml Urin}$
Querempfindlichkeiten:	endogene aromatische Amine, andere Aminophenole

2. Geräte, Chemikalien und Lösungen

2.1. Geräte

(Selbstregistrierendes) Spektrophotometer mit Meßmöglichkeit bei 634 nm
Wasserbad
Graduierte Reagenzgläser mit Normschliff (10 ml Inhalt)
10 mm Küvetten
Pipetten

2.2. Chemikalien

6 N Salzsäure
0,2 N Natriumhydroxyd
Phenol p. a.
Natriumcarbonat, wasserfrei p. a.
Brom
N-Acetyl-p-aminophenol

2.3. Lösungen

Bromwasser: gesättigte wäßrige Lösung
Natriumcarbonatlösung: 10 g Natriumcarbonat mit dest. Wasser zu 100 ml lösen.
Phenollösung: 1 g Phenol mit dest. Wasser zu 100 ml lösen.

Hypobromit-Lösung: 3 ml Bromwasser mit 20 ml 10%iger Natriumcarbonat-Lösung mischen; frisch bereiten!

Reagenz: 8 Teile 0,2 N Natriumhydroxid, 1 Teil 1%ige Phenollösung und 1 Teil Hypobromit-Lösung mischen.

Unmittelbar vor dem Gebrauch herstellen!

2.4. Vergleichsstandard

Stammlösung:

100 mg N-Acetyl-p-aminophenol in 100 ml Wasser.

Durch entsprechende Verdünnungen werden daraus Eichlösungen von 50 bis 600 µg/ml N-Acetyl-p-aminophenol hergestellt.

1 µg N-Acetyl-p-aminophenol entspricht 0,725 µg p-Aminophenol.

3. Probenahme

Möglichst 24-h-Harn

4. Analytische Bestimmung

In ein graduiertes Reagenzglas werden nacheinander 0,5 ml Harn, 1,5 ml 6 N Salzsäure und 1 ml Wasser gegeben. Das Gemisch wird 30 min im kochenden Wasserbad hydrolysiert. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wird mit Wasser auf 5 ml aufgefüllt und gemischt. 1 ml dieser Lösung wird in ein anderes graduiertes Reagenzglas gefüllt und mit 10 ml Reagenz versetzt. Mischen. Bei höheren Konzentrationen färbt sich die Lösung rasch blau. Messung nach 40 min bei 634 nm gegen einen gleich behandelten Blindansatz (0,5 ml aqua dest. statt Urin).

5. Berechnung des Analysenergebnisses

Im Bereich von 20–450 µg p-Aminophenol/ml Urin ist die Eichfunktion $M = f_e(X^*)$ bei $\Delta M = \Delta E_{634\text{ nm}/10\text{ mm}}$ linear*).

* Vgl. Allg. Vorbemerkungen, S. 10.

Bei einer Schichtdicke von 10 mm beträgt der reziproke Eichfaktor für die mit N-Acetyl-p-aminophenol und Urin erstellte Eichkurve

$$k' = \frac{X^*}{\Delta E_{634 \text{ nm}/10 \text{ mm}}} = 378 \mu\text{g } p\text{-Aminophenol/ml Harn}$$

Hierbei ist $\Delta E = E - E_0$ die Extinktion bei 634 nm.

Die p-Aminophenol-Konzentration in 1 ml Harn beträgt dann

$$C = \Delta E_{634 \text{ nm}/10 \text{ mm}} \cdot 378 \mu\text{g/ml Harn}$$

6. Beurteilung des Verfahrens

6.1. Nachweisgrenze

Zur Bestimmung der Nachweisgrenze wurde eine Leerharn-Probe 10 mal in der beschriebenen Weise analysiert. Dabei wurde eine Extinktion von $0,025 \pm 0,009$ ermittelt.

Unter den gegebenen Analysenbedingungen beträgt damit die Nachweisgrenze $20 \mu\text{g } p\text{-Aminophenol/ml Urin}$.

6.2. Präzision

Aus insgesamt 20 Einzelbestimmungen mit Zusatz von N-Acetyl-p-aminophenol zu Urin in Konzentrationen von $300 \mu\text{g/ml}$ wurde eine relative Standardabweichung von 2,5% bestimmt (Streubereich $u = 5,25\%$).

Weiter wurde der Urin einer Person, die N-Acetyl-p-aminophenol eingenommen hatte, 10 mal untersucht. Hierbei wurde ein Mittelwert entsprechend $444,3 \mu\text{g } p\text{-Aminophenol/ml Urin}$ festgestellt. Die relative Standardabweichung betrug 2,4% (Streubereich $u = 5,35\%$).

6.3. Richtigkeit

Insgesamt wurde 15 Urinproben N-Acetyl-p-aminophenol in Konzentrationen von 100, 200 und $400 \mu\text{g/ml}$ zugesetzt. Die Analyse erfolgte nach der beschriebenen Methode. Im Mittel wurden 92% der zugesetzten Menge wiedergefunden.

6.4. Störeinflüsse

p-Aminophenol findet sich normalerweise nicht im menschlichen Harn.

Nach Dubach [5] können allerdings im Harn ausgeschiedene endogene aromatische

Amine in dem angegebenen Verfahren zu einer schwachen Blaufärbung mit einer Extinktion bei 634 nm bis maximal $\Delta E = 0,06$ führen.

Auch von anderen *p*-Aminophenolen ist ein positiver Reaktionsausfall unter den angegebenen Bedingungen zu erwarten. Die Absorptionsmaxima der entsprechenden Indophenole können unterschiedlich sein.

Entscheidend für die Bildung eines blauen Farbstoffes ist die *p*-Substitution: *o*-Aminophenol liefert z. B. ein grünes, *m*-Phenylendiamin ein gelbes Reaktionsprodukt. Hydrochinon und verwandte Verbindungen reagieren nicht [6].

Nach Lorentz [7] bildet sich kein blauer Indophenolfarbstoff mit aromatischen Aminen ohne OH-Substitution in *p*-Stellung (Anilin: gelbrot; 1-Naphthylamin, 2-Naphthylamin: farblos; Benzidin: rötlich).

7. Diskussion

Das Absorptionsspektrum des Indophenol-Farbstoffes aus *p*-Aminophenol wurde zwischen 800 und 360 nm aufgenommen (Abb. 1). Das Maximum liegt bei 634 nm. Die Eichkurve (Abb. 2) wurde durch Zusatz von N-Acetyl-*p*-aminophenol zu Urin erstellt. Die in der Eichkurve angegebenen Extinktionen wurden bereits auf *p*-Aminophenol umgerechnet.

Die Eichkurve ist zwischen 20 und 450 μg *p*-Aminophenol/ml Urin linear. Das Lambert-Beersche Gesetz ist anwendbar. Das Analysenergebnis kann daher direkt mit Hilfe des reziproken Eichfaktors k' aus der gemessenen Extinktion bestimmt werden.

Im arbeitsmedizinischen Bereich muß bei der Beurteilung eines erhaltenen Analyseergebnisses noch berücksichtigt werden, daß auch bei Einnahme von Medikamenten (Schmerzmitteln), die Phenacetin oder verwandte Verbindungen enthalten, mit dem angegebenen Verfahren im Urin *p*-Aminophenol gefunden wird.

8. *p*-Aminophenol

p-Aminophenol, $\text{C}_6\text{H}_7\text{ON}$



wird im Harn in konjugierter Form u. a. nach Aufnahme von

Anilin (MAK-Wert 1976 : 5 ppm; 19 mg/m^3)

p-Anisidin (MAK-Wert 1976 : 0,1 ppm; 0,5 mg/m^3)

Nitrobenzol (MAK-Wert 1976 : 1 ppm; 5 mg/m^3)

ausgeschieden.

Die quantitative Bestimmung im Urin ist nur nach Hydrolyse möglich. Sie kann einen wertvollen Hinweis für die Beurteilung einer Exposition mit den oben genannten Verbindungen geben.

Der größte Teil einer aufgenommenen Anilindosis wird innerhalb der folgenden 24 Stunden als *p*-Aminophenol konjugiert im Harn ausgeschieden [1, 2].

Der Verdacht einer gefährlichen Exposition mit Anilin ist gegeben, wenn die *p*-Aminophenol-Ausscheidung 50 mg/l überschreitet [3].

Toxische Wirkung von Anilin auf den Menschen s. [2].

Über die *p*-Aminophenol-Ausscheidung im Urin nach Aufnahme von Nitrobenzol und *p*-Anisidin beim Menschen ist wenig bekannt.

9. Literatur

- [1] R. T. Williams, Detoxication Mechanism. Chapman & Hall, London 1959.
- [2] D. Henschler, Gesundheitsschädliche Arbeitsstoffe. Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr. 1974.
- [3] R. Lauwerys, Scand. J. work. environ & health 1, 139 (1975).
- [4] R. M. Welch und A. H. Conney, Clin. Chem. 11, 1064 (1965).
- [5] U. C. Dubach, Dtsch. Med. Wschr. 92, 211 (1967).
- [6] W. T. Bolleter, C. J. Bushman und P. W. Tidwell, Analyt. Chem. 33, 592 (1961).
- [7] K. Lorentz, Z. Klin. Chem. u. Klin. Biochem. 5, 291 (1967).

Autor: S. Goenechea

Prüfer: M. Geldmacher-v. Mallinckrodt

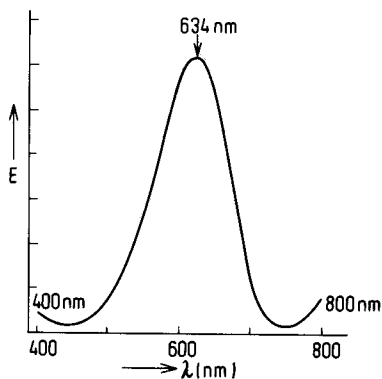


Abb. 1. Absorptionsspektrum der Indophenolverbindung aus *p*-Aminophenol.

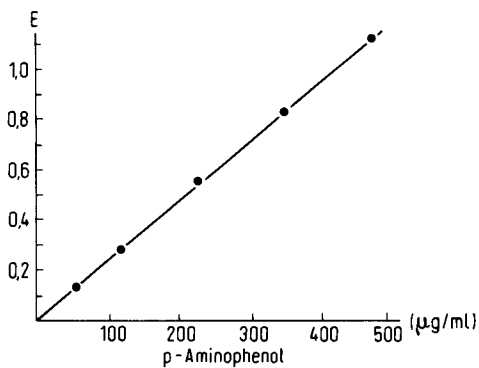


Abb. 2. Eichkurve für *p*-Aminophenol nach Zusatz von N-Acetyl-*p*-aminophenol zu Urin, bei 634 nm und 10 mm Schichtdicke. Ordinate: Extinktion, Abszisse: *p*-Aminophenol-Konzentration in µg/ml Urin.

