

81. Zur Bestimmung des Cibazols und anderer Sulfanilamide

von Jean Druey und Gustav Oesterheld.

(15. V. 42.)

Die quantitative Bestimmung der Sulfanilamide beruht auf der Überführung in einen Farbstoff, der sich zur Kolorimetrierung eignet. Angriffspunkt aller Methoden ist dabei die aromatische Aminogruppe. Diese wird entweder diazotiert und mit einer geeigneten Kupplungskomponente zu einem Azofarbstoff gekuppelt, oder sie wird zu einer gefärbten *Schiff'schen* Base kondensiert. Für letzteres Verfahren ist die Kondensation mit β -Naphthochinon-4-sulfosäure¹⁾ sowie besonders mit p-Dimethylamino-benzaldehyd²⁾ vorgeschlagen worden.

Das erstere Verfahren — Bildung eines Azofarbstoffes — ist das weit üblichere. An Kupplungskomponenten, die vorgeschlagen wurden, sind besonders zu nennen: Dimethyl- α -naphthylamin³⁾, Äthyl- α -naphthylamin⁴⁾, N-(1-Naphthyl)-äthylendiamin⁵⁾, Acetyl-H-Säure⁶⁾. Vor allem hat sich die Methode von *Bratton* und *Marshall* mit N-(1-Naphthyl)-äthylendiamin eingebürgert, ganz besonders in der angelsächsischen Literatur. Sie wird dort fast ausschliesslich für Sulfanilamid sowie für alle möglichen, erst später eingeführten Sulfanilamidderivate verwendet, obwohl sie ursprünglich für den unsubstituierten Grundkörper (p-Aminobenzolsulfamid) ausgearbeitet wurde. Bei allen Vorteilen hat das *Marshall'sche* Verfahren seinen Nachteil, der besonders bei substituierten Sulfanilamiden wie dem Cibazol unangenehm werden kann: die Schwerlöslichkeit des entstehenden Farbstoffs. Diesem Nachteil erliegen auch andere der vorgeschlagenen Kupplungskomponenten, z. B. das Äthyl- α -naphthylamin von *Hecht*, der denn auch Methanol zusetzt, um das Ausfallen zu verhindern.

Demgegenüber ergibt die von *Oesterheld* vorgeschlagene Acetyl-H-Säure leicht lösliche Azofarbstoffe, auch bei komplizierter gebauten Sulfanilamidderivaten. Ein Nachteil dieser Methode gegenüber den anderen besteht jedoch darin, dass die Acetyl-H-Säure sauer nicht kuppelt — alle Blutfiltrate sind sauer —, sodass ein Zusatz von z. B.

¹⁾ *E. G. Schmidt*, J. Biol. Chem. **122**, 757 (1937—1938).

²⁾ Zusammenfassung bei *Morris*, Biochem. J. **35**, 952 (1941).

³⁾ *Marshall* und Mitarb., J. Am. Med. Ass. **108**, 953 (1937); J. Biol. Chem. **122**, 263 (1937).

⁴⁾ *Hecht*, Derm. Wochenschr. **106**, 261 (1938).

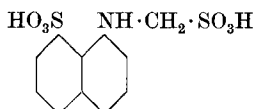
⁵⁾ *Bratton* und *Marshall*, J. Biol. Chem. **128**, 537 (1939).

⁶⁾ *Oesterheld*, Schweiz. Med. Wochenschr. **70**, 459 (1940).

Natriumacetat notwendig wird. Auch wird der entstehende rote Farbstoff gegenüber den stark blaustichigen Färbungen anderer Verfahren nicht so angenehm für die direkte Kolorimetrierung von Auge empfunden. Die Farbintensität ist auch etwas geringer.

Es ist verwunderlich, dass die ursprünglich von *Bratton* und *Marshall* für Sulfanilamid ausgearbeitete Methodik in der Literatur allgemein auch für substituierte Derivate, wie Sulfathiazol und Sulfapyrimidin, angewendet wird, ohne dass je dieses Problem kritisch untersucht worden wäre im Sinne der Forderungen, die die beiden amerikanischen Autoren stellen. *Bratton* und *Marshall* warnten auch ausdrücklich vor Anwendung ihrer Methodik auf neue Sulfanilamide, bevor Kontrollen durchgeführt wurden. Nur *Dunn* und *Gardner*¹⁾ berichten, dass bei der Bestimmung des Sulfathiazols im Urin Ausflockung des gebildeten Azofarbstoffs eintreten kann. Sie sehen sich daher gezwungen, spätestens nach 20—30 Minuten zu kolorimetrieren.

Bratton und *Marshall* untersuchten 17 Kupplungskomponenten; das schliesslich ausgewählte N-(1-Naphtyl)-äthylendiamin gab noch den am leichtesten löslichen Azofarbstoff mit Sulfanilamid. Wir haben nun nach ausgedehnten Untersuchungen in der Formaldehydhydrogensulfitverbindung der 1-Naphtylamin-8-sulfonsäure, der 1-Sulfomethylamino-naphtalin-8-sulfonsäure



eine Kupplungskomponente gefunden, die auch mit Sulfathiazol einen leichter löslichen Farbstoff bildet. Dabei weist sie alle Vorteile der *Marshall'schen* Komponente auf, nämlich rasche Kupplungsfähigkeit, hohe Empfindlichkeit, violette Farbe des Kupplungsproduktes, Unabhängigkeit von p_{H} -Schwankungen bei etwa p_{H} 1—2; d. h. es können sowohl verdünnte Trichloressigsäurelösungen wie solche in n. Salzsäure zur Bestimmung gelangen. Ausserdem ist die 1-Sulfomethylamino-naphtalin-8-sulfonsäure sehr leicht zugänglich aus Naphtylamin-sulfonsäure-1,8, Formaldehyd und Natriumhydrogensulfit.

Der Farbton bleibt während etwa 2 Stunden unverändert, sodass eine grössere Versuchsserie hintereinander kolorimetriert werden kann. Nach längerer Zeit wird die Farblösung zunehmend rotstichiger.

Da die freie neue Kupplungskomponente in saurer Lösung unlöslich ist (sie wird in Lösung als Di-natriumsalz zugesetzt), muss ausdrücklich darauf aufmerksam gemacht werden, dass keine zu grosse Menge derselben verwendet wird. Bei Einhaltung der im

¹⁾ Biochem. J. 35, 1231 (1941).

folgenden beschriebenen Methodik wurde nie ein Niederschlag von freier Disulfonsäure beobachtet. Dabei ist der angewandte Überschuss gross genug, um auch für hohe Mengen Cibazol, wie man sie in der Praxis nie antrifft, zu genügen. Zum Beispiel wird bei der für Blut ausgearbeiteten Methodik so viel Kupplungskomponente zugesetzt, als für einen Cibazolgehalt von etwa 210 mg % ausreichen würde, während Werte über 10 mg % praktisch selten sind.

Bestimmung von Cibazol im Blut.

Es wurde besonders in den beiden Arbeiten von *Marshall*¹⁾²⁾ darauf hingewiesen, dass bei der Sulfanilamidbestimmung im Blut infolge der Enteiweissung Verluste auftreten können. Dies kann dadurch vermieden werden, dass das Blut vor der Fällung der Eiweisskörper genügend verdünnt wird. Wie *Pulver*³⁾ zeigen konnte, beruht der Verlust bei der Enteiweissung auf der Bindung der Sulfonamide an Haemoglobin. Durch die Verdünnung wird eine hydrolytische Spaltung des Komplexes erreicht. Nach der ersten Arbeit von *Marshall* soll bei Verdünnung (Haemolyse) des Blutes im Verhältnis 1:10 oder 1:20 kein Verlust an Sulfanilamid eintreten. In der zweiten Arbeit⁴⁾ lauten die Zahlen für das zurückbestimmte Sulfanilamid aber folgendermassen: 90 % bei Verdünnung 1:4, 94,3 % bei 1:10, 96,9 % bei 1:20 und 99,5 % bei 1:50. Für schwer lösliche Sulfanilamidderivate kann nach *Bratton* und *Marshall*⁵⁾ auch eine Verdünnung von 1:100 notwendig werden, wenn nicht die nachteilige ursprüngliche Methode der Eiweissfällung mit Alkohol angewendet werden soll. Solche Verdünnungen verunmöglichen jedoch die Bestimmung kleiner Mengen, besonders mit einem gewöhnlichen Vergleichs-(Eintauch)-Kolorimeter. Dieses Instrument soll aber besonders berücksichtigt werden, da es allerorts zur Verfügung steht. Die von *Bratton* und *Marshall* für Blut ausgearbeitete Methodik, die von sehr zahlreichen Autoren für die Sulfathiazolbestimmung übernommen wurde, verdünnt das Blut nur im Verhältnis 1:15.

Eine Überprüfung der Situation beim Cibazol war daher angezeigt. Dabei ergab sich, dass tatsächlich auch bei grösseren Verdünnungen, wie sie zur praktischen Durchführung nicht mehr erwünscht sind (1:25, 1:50) noch bedeutende Verluste eintreten. Von Interesse ist dabei die Feststellung, dass beim Versetzen des Blutes mit Trichloressigsäure ohne vorangehende Haemolyse geringere Verluste zu verzeichnen sind. Dies mag darauf beruhen, dass der Eiweissniederschlag im haemolysierten Blut viel feiner und voluminöser ist.

1) J. Biol. Chem. **122**, 263 (1937).

2) J. Biol. Chem. **128**, 537 (1939).

3) Schweiz. Med. Wochenschr. **71**, 1608 (1941).

4) loc. cit., S. 547.

5) loc. cit., S. 549.

In der Tabelle I sind (in Normaldruck) die Werte verzeichnet, die bei der Bestimmung von Blut mit bekanntem Cibazolgehalt ermittelt wurden. Als Eiweissfällungsmittel diente Trichloressigsäure. Verschiedene andere untersuchte Flockungsmittel gaben keinerlei Vorteile, im Gegenteil. Das Blut wurde meist einfach mit Wasser haemolysiert, nachdem die von *Bratton* und *Marshall* verwendete Saponinlösung nie höhere Werte ergeben hatte. Nach diesen Autoren sollten nämlich die Resultate bei unvollständiger Haemolyse zu niedrig ausfallen.

Tabelle I.

Blut mit mg% Cibazol	Gefunden mg %						
	Nicht hämol. 1 T. Blut 9 T. Tri- chloressigs.	Verdünnung des Blutes					
		1 : 5	1 : 10	1 : 15	1 : 20	1 : 25	1 : 50
1,66			1,4	1,35	1,4		
1,92	1,8						
4,55	4,0		3,7; 4,5	4,05; 4,4	4,2	4,55	
5,0	4,1	3,8; 4,8	3,6; 4,85	3,7; 4,7	3,9	4,05	4,3
7,62	6,9	5,4	5,7; 7,5		5,8; 7,45		
10,0			7,7	7,6	8,2		

Es ist daraus ersichtlich, dass bei allgemein etwas schwankenden Werten Verluste bis zu 30 % auftreten.

Wir fanden nun, dass sich beinahe theoretische Werte ergeben, wenn die Eiweisskörper in der Hitze ausgeflockt und heiss abfiltriert werden. Die entsprechenden Zahlen sind in Tabelle I *kursiv gedruckt*. Das Blut wird im Verhältnis 1:10 haemolysiert und bis nahe zum Sieden erhitzt. Dabei werden die Proteine denaturiert ohne auszuflocken; die Lösung wird grau-braun und stark trüb. Durch Trichloressigsäurezusatz flockt das Eiweiss in sehr leicht filtrierbarer Form aus. Es ist anzunehmen, dass infolge des Erhitzens das an Haemoglobin gebundene Cibazol (*Pulver*¹⁾) gelöst wird.

Methodik.

Verwendete Reagenzien:

- Trichloressigsäure 10%
- Natriumnitrit 0,1%
- Sulfaminsäure, $\text{NH}_2 \cdot \text{SO}_3\text{H}$, 0,5%
- 1-Sulfomethylamino-naphtalin-8-sulfonsäure, Di-natriumsalz, 0,1%
- Cibazolösung 3 mg% und 1 mg%

Die Nitritlösung sowie die Lösung der neuen Kupplungskomponente soll alle paar Tage frisch hergestellt werden.

¹⁾ loc. cit.

1 cm³ Blut wird mit 9 cm³ Wasser haemolysiert. Die Blutlösung wird unter leichtem Umschwenken bis nahe zum Sieden erhitzt und hierauf unter Umschwenken mit 5 cm³ Trichloressigsäure versetzt und sofort filtriert. 5 cm³ des Filtrates werden nach dem Abkühlen mit 1 cm³ der Nitritlösung diazotiert. Nach mindestens 3 Minuten Warten (längeres Stehen schadet nicht) wird das überschüssige Nitrit durch Zusatz von 1 cm³ der Sulfaminsäurelösung zerstört. Dabei wird gut umgeschwenkt, um das Entweichen des gebildeten Stickstoffs, der bei der Kolorimetrierung durch Bläschenbildung stören kann, zu erleichtern. Nach mindestens 1 Minute wird die Lösung mit 1 cm³ 1-Sulfomethylamino-naphthalin-8-sulfonsäurelösung versetzt und umgeschwenkt. Der Farbstoff erscheint sofort. Nach kurzer Zeit kann kolorimetriert werden.

Zur Herstellung der Vergleichslösung für die Kolorimetrierung bereitet man sich eine Stammlösung aus 10 cm³ Cibazol 3 mg%, 90 cm³ Wasser und 50 cm³ Trichloressigsäure 10%¹⁾. 5 cm³ dieser Stammlösung werden wie oben mit je 1 cm³ Nitrit, Sulfaminsäure und Kupplungskomponente versetzt. Diese Vergleichs-Farblösung entspricht also einem Cibazolgehalt des Blutes von 3 mg%. Sie ist für die meisten Fälle verwendbar. Ist der Cibazolgehalt bedeutend höher oder niedriger, so ist es ratsam, die Vergleichs-Farblösung der zu erwartenden Stärke anzugleichen.

Bestimmung im Urin.

Der eiweissfreie Urin wird so weit verdünnt, dass er in 100 cm³ etwa 1—2 mg Cibazol enthält. Da meist etwa 100—200 mg% ausgeschieden werden, ist eine Verdünnung 1:100 zweckmässig. 50 cm³ des verdünnten Urins werden mit 20 cm³ n. Salzsäure versetzt und mit Wasser auf 100 cm³ verdünnt. 5 cm³ des angesäuerten Urins werden mit 1 cm³ 0,1-proz. Natriumnitritlösung diazotiert und genau weiterbehandelt wie für Blut angegeben ist. Für die Kolorimetrierung stellt man sich eine Stammlösung aus 50 cm³ Cibazol 1 mg%, 20 cm³ n. Salzsäure und Wasser ad 100 cm³ her (nach einer Woche erneuern). 5 cm³ dieser Lösung werden mit je 1 cm³ der Reagenzien versetzt. Farbgleichheit mit der Harnprobe entspricht dann also einem Urin von 100 mg%, im Falle der Verdünnung 1:100.

Sollte der Urin nach längerem Stehen einen Bodensatz enthalten so wird nach kräftigem Umschwenken eine entnommene abgemessene Probe zunächst mit dem gleichen Volumen Natronlauge 0,1-n. versetzt. Dabei geht das beim Stehen allenfalls ausgeschiedene Cibazol oder Acetyl-Cibazol in Lösung. Es wird nun ebenfalls im Verhältnis 1:100 verdünnt, sodass die Endverdünnung in diesem Fall doppelt so gross ist.

¹⁾ Eine grössere Menge herzustellen hat keinen Zweck, da nach mehrwöchigem Stehen der Gehalt an Cibazol abnimmt, vielleicht durch Einwirkung der Trichloressigsäure auf die NH₂-Gruppe.

Bestimmung in der Muttermilch.

Infolge des hohen Fettgehaltes der Muttermilch ergaben sich Schwierigkeiten bei der Enteiweissung, ganz besonders für Colostrum. Alle Eiweissflockungsmittel führten zu trüben oder unfiltrierbaren Lösungen. Als bester Ausweg erwies sich die Verwendung von scharf zentrifugierter Milch. Das an der Oberfläche sich sammelnde Milchfett enthält sehr wenig Cibazol. 1 cm³ Magermilch wird mit 9 cm³ 10-proz. Trichloressigsäure (bei trüben Filtraten evtl. 5-proz. verwenden) versetzt und nach Umschwenken und einigem Stehen filtriert. Bisweilen ist das Filtrat sofort klar, bisweilen muss es noch 1—2 mal auf das Filter zurückgegossen werden. 5 cm³ des klaren Filtrates werden mit je 1 cm³ Nitrit, Sulfaminsäure und Kupplungskomponente behandelt, wie für Blut angegeben. Eine Stammlösung für den kolorimetrischen Vergleich stellt man sich her aus 10 cm³ Cibazol 1 mg % und 90 cm³ Trichloressigsäure (Haltbarkeit beschränkt). 5 cm³ davon werden wie oben in den Farbstoff übergeführt und entsprechen dann also einem Gehalt der Milch von 1 mg %.

Bestimmung von Acetyl-Cibazol.

Beim präparativen Arbeiten ist die alkalische Hydrolyse von N₄-Acetyl-sulfanilamid-Derivaten gegenüber der sauren meist vorzuziehen, da die Sulfamidgruppe gegen Alkalien beständiger ist. Da alle enteisssten Blutfiltrate sauer sind und die Diazotierung in saurer Lösung erfolgt, ist die saure Verseifung für analytische Zwecke jedoch viel geeigneter. Ausserdem sollen Blutfiltrate bei alkalischer Verseifung vielfach eine Gelbfärbung geben¹⁾. Die saure Hydrolyse ist auch durchaus anwendbar, wenn bestimmte Bedingungen eingehalten werden.

Im weiteren ist zu beachten, ob zu stark saures Milieu die Kupplung zum Farbstoff nicht beeinträchtigt. *Gardner* und *Dunn*²⁾ bemerken, dass die p_H-Änderung, bedingt durch die für die Verseifung nötige Salzsäure, den Farbeffekt herabzusetzen scheint, obwohl doch *Bratton* und *Marshall* die p_H-Unabhängigkeit ihres Farbstoffs hervorgehoben hatten, wenigstens im Falle des unsubstituierten Sulfanilamids. Um diese Frage zu prüfen, wurden je 5 cm³ Blutfiltrat, die einem Cibazolgehalt von 3 mg % entsprachen, mit je 2 cm³ Wasser bzw. Salzsäure von steigender Konzentration versetzt und hierauf mit der neuen Komponente zum Farbstoff gekuppelt. Bis zu n. Salzsäure zeigten sich dabei keinerlei Farbunterschiede, bei 2-n. Salzsäure fiel der Farbton etwas schwächer aus. Zusatz von 2 cm³ konz. Salzsäure verhinderte die Kupplung fast vollständig.

¹⁾ *Scudi* und *Harrison*, J. Lab. Clin. Med. **25**, 404 (1940); ref. Ber. ges. Physiol. **120**, 375.

²⁾ loc. cit.

Tabelle II zeigt den Verseifungsgrad der mit verschiedenen Säuremengen erreicht wird. Je 5 cm³ Trichloressigsäurelösung von der Zusammensetzung des Blutfiltrates, einem Gehalt an Acetyl-Cibazol von 2,16 mg% entsprechend, wurden mit 2 cm³ Säure wachsender Konzentration erhitzt und hernach mit Wasser wieder auf 7 cm³ aufgefüllt. Die Zahlen geben in % an, wieviel von der erwarteten Menge wiedergefunden wurde. Der scheinbare Verlust durch die weniger intensive Färbung bei Verwendung von 2-n. Salzsäure wurde berücksichtigt.

Tabelle II.

Zusatz	Zurückbestimmt			
	Im sied. Wasserbad 60 Min. erhitzt	Am Rückfluss zum Sieden erhitzt		
		15 Min.	30 Min.	60 Min.
Wasser	76			
0,1-n. Salzsäure	73			
0,5-n. Salzsäure	92	85	99	94
n. Salzsäure	99			
2-n. Salzsäure	99			

Es ergibt sich daraus, dass die Verseifung quantitativ verläuft bei 1-stündigem Erhitzen im Wasserbad mit n. Salzsäure oder halbstündigem Sieden am Rückfluss mit 0,5-n. Salzsäure. Das letztere Verfahren ist aber weniger empfehlenswert, da bisweilen eine Trübung auftritt und längeres Erhitzen wieder zu Verlusten führt, wahrscheinlich infolge Verseifung der Sulfamidgruppe. (Die entstehende Sulfanilsäure kuppelt viel langsamer.)

Auf Blut von bekanntem Gehalt an Acetyl-Cibazol angewendet, ergab die Methodik Verluste von ca. 20% bei kalter Enteiweissung nach *Bratton* und *Marshall* bzw. von 5—10% bei Eiweissfällung in der Hitze. *Scudi* und *Harrison*¹⁾ hatten bei Acetyl-Sulfapyridin und saurer Verseifung Verluste von 8%. In seiner ersten Arbeit über die Bestimmung des einfachen Sulfanilamids beschrieb *Scudi*²⁾ jedoch für das Acetyl-Derivat Verluste von über 50% bei Verwendung des *Folin-Wu*-Blutfiltrates und von 36% bei Enteiweissung mit Trichloressigsäure.

Die Bestimmung der Acetyl-Sulfanilamide im Blut ist jedenfalls eine heikle Sache, und es ist jedermann, der sich damit abgibt, zu raten, einige Kontrollversuche durchzuführen. Wenn verschiedene Sulfanilamidverbindungen, wie z. B. das Acetyl-sulfadiazin, im Blut nur in Spuren, wohl aber im Urin vorkommen sollen, so sind solche Angaben kritisch aufzunehmen.

¹⁾ loc. cit.

²⁾ J. Biol. Chem. **122**, 539 (1937—1938).

Methodik der Gesamt-Cibazolbestimmung in Blut, Urin und Muttermilch.

Es werden Reagensgläser verwendet, die bei 7 cm³ eine Marke tragen. Von den Blut- und Milchfiltraten werden 5 cm³ mit n. Salzsäure bis zur Marke aufgefüllt; vom Urin wird die verdünnte mit Salzsäure versetzte Lösung bis zur Marke gegeben. Nach 1-stündigem Erhitzen im siedenden Wasserbad und Abkühlen wird mit Wasser wieder bis zur Marke aufgefüllt und mit je 1 cm³ der Reagenzien (Nitrit, Sulfaminsäure, Kupplungskomponente) versetzt. Zur Kolorimetrierung verwendet man dieselben Vergleichslösungen wie bei der Bestimmung des freien Cibazols, jedoch mit einem Zusatz von 2 cm³ n. Salzsäure.

Wissenschaftliche Laboratorien der
Gesellschaft für Chemische Industrie in Basel,
Pharmazeutische und Analytische Abteilung.

82. Veilchenriechstoffe.

(13. Mitteilung¹⁾).

Über das ätherische Öl der Veilchenblüten²⁾

von L. Ruzicka und H. Schinz.

(15. V. 42.)

Das Veilchenblütenöl ist wohl eines der kostbarsten ätherischen Öle. Seine Gestehungskosten sind so hoch, dass dieses Öl aus dem Handel praktisch verschwunden ist und anscheinend nur selten Anwendung in der Parfümerie findet.

Wir kamen 1927 in den Besitz von 400 g eines Veilchenblütenextraktes dieses Jahrgangs einer Grasser Firma. Die damals noch im Utrechter Laboratorium durchgeführte zweimalige Destillation dieses Extraktes mit Wasserdampf lieferte uns 23 g ätherisches Öl mit folgenden physikalischen Konstanten:

$$\alpha_D = +8,7^\circ; d_4^{13} = 0,956$$

Man findet in der Literatur nur eine Beschreibung des ätherischen Veilchenblütenöls. *v. Soden*³⁾ erhielt durch zweimalige Wasserdampf-

¹⁾ 12. Mitt. Helv. **25**, 188 (1942).

²⁾ Der Inhalt dieser Abhandlung bildete Gegenstand eines Vortrages in der Société de Chimie Industrielle in Paris im Herbst 1937. Vgl. darüber die Oktober-Nummer von „Chimie et Industrie“ 1937.

³⁾ J. pr. [2] **69**, 260 (1904).