

# PIN-Konzept zum Nachweis organischer Stoffgruppen

## Teil 1: Herstellen der Reagenzien

### Aceton-Reagenz:

siehe Dinatriumpentacyanonitrosylferrat-RM

### Ammonium-Cer(IV)-nitrat-Lösung:

10 g Ammonium-Cer(IV)-Nitrat werden in 50 ml Wasser gelöst, mit 14 ml Salpetersäure (w = 65 %) versetzt und mit Wasser zu 100 ml aufgefüllt. Solange die Lösung gelb gefärbt ist, ist sie verwendbar.

### Bromthymolblau-Lösung, alkalisch:

20 mg Bromthymolblau werden in 15 ml Natronlauge 1 mol/l gelöst, mit 20 ml Ethanol (Brennspiritus) versetzt und mit Wasser zu 100 ml aufgefüllt.

Alternativ können auch 20 ml Bromthymolblau-Lösung (w = 0,1 % in Ethanol) mit 15 ml Natronlauge 1 mol/l gemischt, und anschließend mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt werden.

### Dinatriumpentacyanonitrosylferrat RM nach AB 2 DDR DL:

0,25 g Nitroprussidnatrium (Dinatriumpentacyanonitrosylferrat), 50 g wasserfreies Natriumcarbonat und 50 g Ammoniumsulfat werden sorgfältig in einer Reibschale miteinander verrieben und in einer dichtschießenden Braunglasflasche vor Feuchtigkeit geschützt aufbewahrt.

### 2.4. Dinitrophenylhydrazin-Lösung:

50 ml Wasser werden in einem Becherglas mit 16,5 ml Salzsäure 37 % gemischt. Es werden 0,50 g 2.4. Dinitrophenylhydrazin zugegeben und bis zur Auflösung der Substanz auf einem Magnet-Rührgerät längere Zeit gerührt. Ist die Substanz fast vollständig gelöst, wird die Mischung in einen 100 ml Maßkolben filtriert und anschließend mit Wasser bis zur Marke aufgefüllt.

### Eisen(III)-chlorid-Lösung 0,1 mol/l:

2,7 g Eisen (III) -chlorid-6 Hydrat werden in Wasser gelöst und zu 100 ml aufgefüllt.

### Iod – Lösung 0,05 mol/l:

12,7 g Iod und 25 g Kaliumiodid werden trocken in einem Becherglas durch Umschütteln gemischt, durch tropfenweisen Zusatz von Wasser in Lösung gebracht (Abkühlung!!!) und nach völliger Lösung mit Wasser auf 1000 ml aufgefüllt. Diese Lösung wird in einer Flasche aus braunem Glas aufbewahrt.

### Kupfersulfat-Lösung 0,1 mol/l:

2,5 g Kupfersulfat 5 Hydrat werden in Wasser gelöst und zu 100 ml aufgefüllt.

### Kupfersulfat-Zitronensäure-Mischung:

25 g Kupfersulfat 5 Hydrat und 75 g Zitronensäure werden sorgfältig miteinander in einer Reibschale verrieben, anstelle von Zitronensäure kann auch Weinsäure eingesetzt werden.

### 1 mol/l Natronlauge (Reagenz):

4 g Natriumhydroxid oder 10 ml Natronlauge (w = 33 %) werden mit Wasser zu 100 ml aufgefüllt.

### Thymolphthalein-Lösung 0,1 %:

0,1 g Thymolphthalein werden in Ethanol (Brennspiritus) gelöst und mit Ethanol zu 100 ml aufgefüllt.

## Teil 2: Übersicht der Vergleichssubstanzen für das PIN-Konzept

Die Vergleichssubstanzen sind als etwa 10 Volumen-prozentige wässrige Lösungen angesetzt. Dies erfolgt aus Gründen der Praktikabilität.

Dadurch wird die Verdunstung bei längerer Lagerung minimiert, aber auch das Gefährdungspotenzial und die Geruchsbelästigung. Essigsäureethylester wird durch Triacetin ersetzt, dies wird unverdünnt beigegeben (mit Wasser nicht verdünnbar).

Für die Verdünnung der Vergleichssubstanzen mit Wasser spricht noch ein weiterer Vorteil: Durch den hohen Wasseranteil bilden sich richtige Tropfen auf dem laminierten Tüpfelraster aus, während z.B. reiner Alkohol zerfließt.

Glucose wird als Festsubstanz beigelegt, da die wässrige Lösung mikrobiell nicht stabil ist und bei der Lagerung die Gefahr des Verschimmeln besteht.

<b>Alkohole</b>	<b>Carbonyle</b>	<b>Carbonsäuren</b>	<b>Mehrwertige Alkohole</b>	<b>Ester</b>
Ethanol Spiritus (mit EMK vergällt)	Aceton Butanon (EMK, Ethylmethylketon)	Ameisensäure Essigsäure Milchsäure	Ethylenglykol (1,2 Ethandiol) Glycerin (1,2,3 Propantriol)	Triacetin

### **Salzlösung:**

Essigsäure-Natriumacetat-Lösung:

5 g Natriumacetat-3 Hydrat in 25 ml Essigsäure (w = 25 %, Essigessenz) lösen.

### **Feststoff:**

Glucose

### **Weitere benötigte Stoffe zur Durchführung der Tests:**

Natriumhydroxid-Plätzchen für den Fehling-Test

Natriumhydrogencarbonat für Eisen(III)-chlorid-Test, falls Essigsäure verwendet werden soll

## Teil 3: Durchführung der Tests

### 1. Bromthymolblau- Test

#### Geräte und Chemikalien:

Tüpfelraster, Bromthymolblau-Lösung

#### Durchführung:

*Unterlage:* weiß

1 Tropfen Bromthymolblau-Lösung, 1 Tropfen Probe

*positiv:* Farbumschlag von blau nach gelb

#### ausgetestete Substanzen:

Ameisensäure, Essigsäure, Milchsäure (auch andere Säuren ergeben Umschlag)

### 2. Ammonium-Cer(IV) -nitrat – Test

#### Geräte und Chemikalien:

Tüpfelraster, Ammonium-Cer(IV) -nitrat-Lösung

#### Durchführung:

*Unterlage:* weiß

1 Tropfen Ammonium-Cer (IV) -nitrat-Lösung, 1 Tropfen Probe

*positiv:* Farbumschlag von gelb nach orangerot

#### ausgetestete Substanzen:

Methanol, Ethanol, 1-Propanol, 2 – Propanol, Ethylenglycol, Glycerin

#### Hinweise:

der orangerote Farbkomplex ist nicht lange beständig

### 3. Kupfersulfat-Test

#### Geräte und Chemikalien:

Tüpfelraster, Natronlauge 1 mol/l, Kupfersulfat-Lösung 0,1 mol/l

#### Durchführung:

*Unterlage:* weiß

1 Tropfen Probe, 1 Tropfen Natronlauge, 1 Tropfen Kupfersulfat-Lösung

*positiv:* klare dunkelblaue Lösung, die intensiver blau als Kupfersulfat-Lösung gefärbt ist als

#### ausgetestete Substanzen:

Ethylenglycol, Glycerin, Glucose

### 4. Eisen(III)-chlorid-Test

#### Geräte und Chemikalien:

Tüpfelraster, Eisen(III)-chlorid-Lösung

#### Durchführung:

*Unterlage:* weiß

1 Tropfen Probe, 1 Tropfen Eisen(III)-chlorid-Lösung

*positiv:* Farbumschlag von hellgelb nach dunkelrot

#### ausgetestete Substanzen:

Essigsäure, Natriumacetat-Essigsäure,

#### Hinweise:

Nachweis gelingt nur in neutraler bzw. schwach saurer oder alkalischer Lösung (pH 6 – 8)

Zu Essigessenz eine Spatel-Spitze Natriumhydrogencarbonat geben, nach Beendigung der Gasentwicklung Eisenchlorid-Lösung zugeben

## 5. Rojahn-Test

### Geräte und Chemikalien:

Tüpfelplatte weiß aus Porzellan oder Kunststoff,  
Natronlauge 1 mol/l, Thymolphthalein-Lösung

### Durchführung:

*Unterlage:* weiße Tüpfelplatte aus Porzellan

2 Tropfen Triacetin, 2 Tropfen Indikator, 2 Natronlauge, nicht mischen

*positiv:* Entfärbung nach ca. einer Minute, nicht schlagartig

### Ausgetestete Substanzen:

Essigsäureethylester, Triacetin

Auch die Produkte der Verseifung können bei Triacetin (Ester von Glycerin und Essigsäure) nachgewiesen werden:

### Geräte und Chemikalien:

Tüpfelplatte weiß aus Porzellan oder Kunststoff,  
Natronlauge 1 mol/l, Thymolphthalein-Lösung, Eisen(III)-chlorid-Lösung,  
Kupfersulfat-Lösung, Triacetin

### Durchführung: (kombiniert mit Acetat-Nachweis)

*Unterlage:* weiße Tüpfelplatte aus Porzellan

1 Tropfen Natronlauge, 1 Tropfen Indikator, 3 Tropfen Probe, gut mischen

*positiv:* Entfärbung nach einigen Minuten, nicht schlagartig

nach Entfärbung: 1 Tropfen Eisen(III)-chlorid-Lösung

*positiv:* Farbumschlag nach rotorange

### Durchführung: (kombiniert mit Glycerin-Nachweis)

*Unterlage:* weiße Tüpfelplatte aus Porzellan

1 Tropfen Natronlauge, **kein Indikator!** 3 Tropfen Probe, gut mischen

*positiv:* Entfärbung nach einigen Minuten, nicht schlagartig

nach Entfärbung: 1 Tropfen Kupfersulfat-Lösung

*positiv:* Farbumschlag nach dunkelblau (Farbe intensiver als die Kupfersulfat-Lösung!)

## 6. Fehling-Test

### Geräte und Chemikalien:

Reagenzgläser

Glucose, Natriumhydroxid-Plätzchen

Kupfersulfat- Zitronensäure -Mischung

### Durchführung:

- 1 cm hoch Wasser einfüllen
- 1 Stevia-Löffel Kupfersulfat-Zitronensäure-Verreibung zugeben
- 1 Natriumhydroxid-plätzchen mit der Pinzette einwerfen,
- schütteln

### Beobachtung:

Es findet ein Farbumschlag von blau nach rotbraun statt.

**Hinweise zum Arbeitsschutz:**

- Die alternative Fehling-Probe niemals auf dem Tüpfelraster durchführen!
- Schutzbrille tragen!
- Reagenzgläser gleich reinigen
- evtl. unter Zusatz von verdünnter Säure Kupfer(I)-oxid-Reste lösen

**7. Dinitrophenylhydrazin – Test****Geräte und Chemikalien:**

Tüpfelraster, empfehlenswert für diesen Test ist eine Tüpfelplatte aus Porzellan mit weißen und schwarzen Feldern, 2,4, Dinitrophenylhydrazin-Lösung

**Durchführung:**

*Unterlage:* schwarz

1 Tropfen Probe, 1 – 2 Tropfen 2,4, Dinitrophenylhydrazin-Lösung

*positiv:* Bildung eines gelblichen Niederschlages

**ausgetestete Substanzen:**

Aceton, Methylisobutylketon, Ethylmethylketon, Formaldehyd, Acetaldehyd, Propionaldehyd

**Hinweise:**

Die Verwendung von Tüpfelplatten aus Porzellan ist empfehlenswert. Werden Tüpfelraster verwendet, lassen sich die Niederschläge mit Natronlauge 1 mol/l entfernen, diese evtl. einige Minuten einwirken lassen. Spiritus entfernt die Rückstände sofort.

**8. Jodoform-Test****Geräte und Chemikalien:**

Tüpfelraster,

Natronlauge 1 mol/l, Iod-Lösung 0,05 mol/l, keine Iod-Kaliumiodid-Lösung nach Lugol

**Durchführung:**

*Unterlage:* schwarz

1 Tropfen Probe, 2 Tropfen Natronlauge, 2 Tropfen Iod-Lösung

*positiv:* Bildung eines gelblichen Niederschlages, Geruch nach Jodoform (Apotheke)

**ausgetestete Substanzen:**

Ethanol, Aceton, Milchsäure, Methylmethylketon, Methylisobutylketon

**Hinweise:**

Natronlauge entfärbt Iod-Lösung, es entsteht Hypoiodit und Iodid

**9. Nitroprussid-Natrium-Test****Geräte und Chemikalien:**

Tüpfelraster, Spatel

Dinatriumpentacyanonitrosylferrat-RM nach AB2- DDR (DL) = Aceton-Reagenz

**Durchführung:**

*Unterlage:* weiß

1 Spatel-Spitze „Aceton-Reagenz“ auf das Tüpfelraster geben und 1 -2 Tropfen Probe in das Reagenz geben

*positiv:* Farbumschlag nach rotviolett nach einigen Minuten

**ausgetestete Substanzen:**

Aceton, Methylmethylketon, Acetylaceton, Methylisobutylketon (schwach)

**Hinweise:**

Reagenz ist nahezu unbegrenzt haltbar, wenn es vor Feuchtigkeit geschützt aufbewahrt wird

## 4. Teil: Chemischer Hintergrund

### 1. Bromthymolblau- Test

Bromthymolblau ist ein bekannter pH – Indikator, welcher im Bereich von pH 5,8 bis pH 7,6 von gelb über grün nach blau umschlägt. Eine blaue, alkalisierte Bromthymolblau-Lösung schlägt nach Zusatz einer Carbonsäure nach gelb um.

### 2. Ammonium-Cer(IV)-nitrat – Test

Alkohole bilden mit Ammonium-Cer(IV)-Nitrat in salpetersaurer Lösung eine dunkel orange gefärbte Komplexverbindung.



Cer(V)-Verbindungen sind gelb gefärbt und wirken als Oxidationsmittel. Sie werden zum farblosen Cer (III) - Ion reduziert.

Aus diesem Grunde ist der gebildete Farbkomplex nicht sehr lange beständig.

Ammonium-Cer(IV)-Nitrat-Lösung ist solange verwendbar, wie sie eine gelbe Färbung besitzt. Ist die Lösung farblos, ist diese unbrauchbar.

### 3. Kupfersulfat-Test

Verbindungen mit mehreren Hydroxylgruppen bilden in alkalischer Lösung mit Kupfersulfat dunkelblaue Farbkomplexe.

### 4. Eisen(III) -chlorid-Test

Acetat-Ionen bilden mit Eisen(III)-chlorid-Lösung eine dunkelrote Färbung von Eisen (III)-Acetat. Die Bildung von Eisen-Acetat erfolgt nur in neutraler, schwach saurer bzw. schwach basischer Lösung. Für das Experiment zur Identifikation kann man zweckmäßig bereits Natriumacetat in Essigsäure lösen.

### 5. Rojahn-Test

Diese Reaktion dient zum Nachweis von Estern, das Prinzip ist die Verseifung im alkalischen Medium. Die zu untersuchende Probe wird mit Natronlauge und Phenolphthalein versetzt und gut gemischt. Nach einigen Minuten tritt Entfärbung ein. Neben Phenolphthalein ist auch Thymolphthalein und Cresolphthalein verwendbar. Die Reaktion wird zweckmäßigerweise auf einer Tüpfelplatte aus Porzellan durchgeführt, hier ist die Mischung der Komponenten besser möglich als auf einem laminierten Tüpfelraster. Sinnvollerweise führt man hier auch eine Blindprobe (nur Indikator und Natronlauge) durch. Die Entfärbung dauert einige Minuten, sie erfolgt nicht so schlagartig wie bei einer Neutralisation. **Als Alternative zum Ethylacetat bietet sich Triacetin (Glycerintriacetat) an. Vorteil ist, dass die Produkte der Verseifung nachweisbar sind, Glycerin mit Kupfersulfat, Acetat mit Eisen(III) -chlorid.**

### 6. Fehling-Test

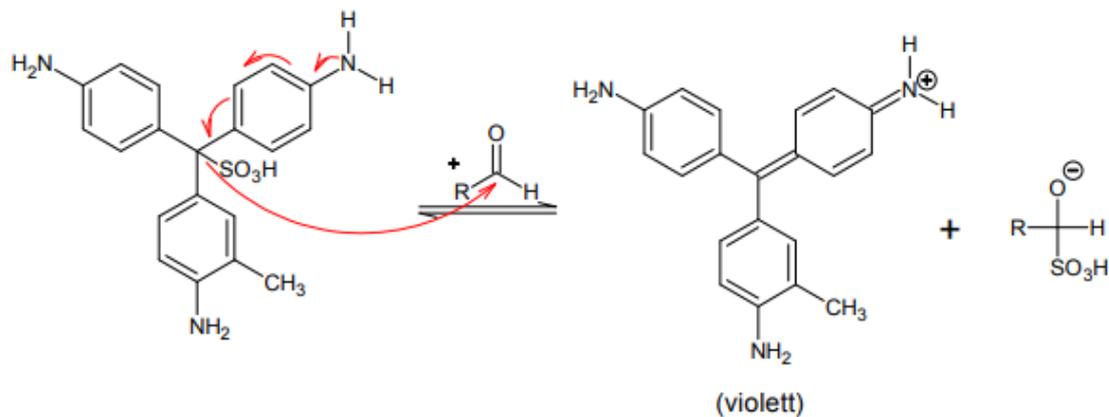
Die ablaufenden Reaktionen der klassischen und modifizierten Fehling-Proben sind identisch. Zweiwertige Kupferionen werden in alkalischer Lösung durch reduzierende Stoffe zu einwertigen Kupferionen oder Kupfer reduziert. Komplexbildner (z.B. Salze der Wein - und Zitronensäure verhindern die Ausfällung von Kupferhydroxid in alkalischer Lösung).

Um die Prozedur zu vereinfachen, wird mit der Lösungswäre eines Natriumhydroxid-Plätzchens gearbeitet. Dadurch darf die Wassermenge maximal 1 cm hoch sein, sonst reicht die Wärmemenge nicht aus.

Durch dieses Verfahren ist kein Brenner oder Wasserbad nötig, Siedeverzüge werden vermieden.

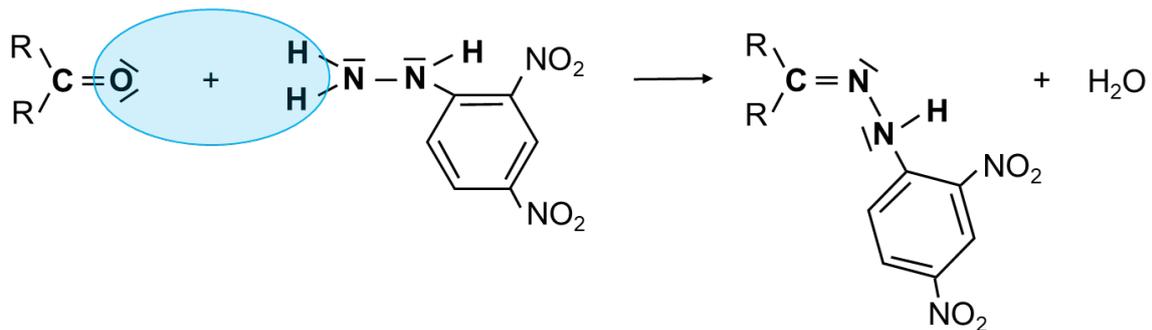
## Schiff - Test

Schiffs- Reagenz ist eine durch Schweflige Säure entfärbte Fuchsin-Lösung. Sie reagiert mit Aldehyden unter Bildung eines rotvioletten Farbkomplexes.



## 7. Dinitrophenylhydrazin – Test

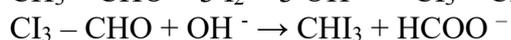
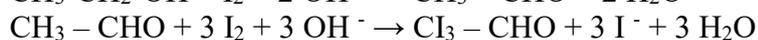
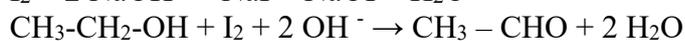
Carbonyl-Verbindungen wie Aldehyde und Ketone bilden mit 2,4, Dinitrophenylhydrazin in einer Kondensationsreaktion unlösliche Hydrazone. Durch die Bestimmung des Schmelzpunktes können die Carbonyl-Verbindungen identifiziert werden (was natürlich im Microscale-Maßstab nicht möglich ist).



## 8. Jodoform-Test

Oxo-Verbindungen mit der allgemeinen Struktur  $\text{CH}_3\text{-CO-C-R}$  bzw. auch  $\text{CH}_3\text{-CHOH-R}$  reagieren mit Iod und Natronlauge unter Bildung von Jodoform (Triiod-Methan), welches als gelber Niederschlag mit dem charakteristischen Apothekengeruch ausfällt.

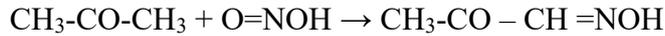
Aus Iod und Natronlauge entsteht Natrium-Hypoiodit. Dieses reagiert mit Ethanol, es entsteht Triiodacetaldehyd. In alkalischer Lösung zerfällt dieses in Jodoform und Natrium-Formiat.



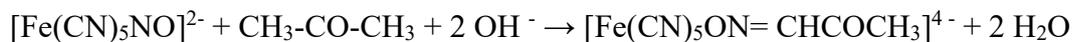
## 9. Nitroprussid-Natrium-Test

Im Natriumnitroprussid (Dinatriumpentacyanonitrosylferrat) ist der Nitrosyl – Ligand ganz locker gebunden. Methylketone und andere aktivierte Methylengruppen (z. B. CH – acide Ketone darunter auch Aceton reagieren in schwach alkalischer Lösung unter Bildung von Isonitrosoketonen, die mit weiteren Nitroprussid-Natrium unter Bildung eines Farbkomplexes reagieren.

Aceton reagiert mit Nitrit-Ionen, es entsteht zunächst Isonitroso-Aceton



Diese reagiert in weiteren Natrium-Nitroprussid (Natriumpentacyanonitrosylferrat), es entsteht ein violetter Farbkomplex. Gleichzeitig wird das im Nitroprussid vorliegende dreiwertige Eisen zum zweiwertigen reduziert.



Andere Ketone reagieren auch mit diesem Reagenz. Es lässt sich möglicherweise zur in Kombination mit dem 2.4. Dinitrophenylhydrazin-Test zur Differenzierung Aldehyd –Keton einsetzen. Aus dem Band Diagnostische Laboratoriumsmethoden des 2. Arzneibuches der DDR stammt die Rezeptur. Dies war die amtliche Sammlung von Analysenmethoden für das medizinische Labor. Es war zum Nachweis von Aceton im Urin seinerzeit vorgeschrieben. Das Reagenz ist gut verschlossen und vor Feuchtigkeit geschützt, unbegrenzt haltbar. Aufgrund der geringen Konzentration an Natriumnitroprussid ist dieses Reagenz nicht mehr als giftig eingestuft. Wässrige Lösungen von Natriumnitroprussid sind nicht haltbar und müssen frisch angesetzt werden.