

# O nekim mogućnostima brzog prosuđivanja vrijednosti otopina adrenalina

---

**Barković, D.; Fintić, V.**

*Source / Izvornik:* **Farmaceutski glasnik, 1951, 7, 341 - 347**

**Journal article, Published version**

**Rad u časopisu, Objavljena verzija rada (izdavačev PDF)**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:039814>

*Rights / Prava:* [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-05-17**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



### NAUČNO-PRAKTIČNI DIO

D. Barković i V. Fintić:

#### **O nekim mogućnostima brzog prosuđivanja vrijednosti otopina adrenalina**

(Iz Zavoda za farm. kemiju Farm. fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.)

(Primljeno 7. V. 1951.)

Razmotrimo li u različnim farmakopejama propise za ispitivanje 0,1% otopine adrenalina (Sol. Adrenal. hydrochl., Injectab. Adrenal.), zapaziti ćemo, da se oni — izuzev na identitet — ponajčešće odnose samo na izgled preparata. Propisuje se naime, da preparat mora biti bistar i bezbojan, odnosno da smije biti posve slabe crvenkaste boje. Ph. Helv. V. (1) na pr. propisuje osim toga i maksimalnu dozvoljenu koncentraciju vodikovih iona, pa ispitivanje na višak sulfita, koji se otopini dodaje u svrhu stabilizacije. USP XIII. (2) propisuje kod adrenalina i njegovih solucija biološko određivanje vrijednosti. Približno, kolorimetrijsko određivanje kod oficinalnih preparata adrenalina uvela je od dosadašnjih (pristupačnih) farmakopeja prva Ph. Dan. IX. (3).

Farmakopeje nastoje ovaj nedostatak obično nadomjestiti tako, što propisuju izradu 0,1% solucije iz oficinalnog adrenalina. Međutim, kad preparat nije ispravno izrađen, ili kad se nabavlja izvan apoteke, nije moguće na temelju propisa većine farmakopeja ni približno prosuditi sadržaj adrenalina u preparatu.

Za identificiranje kao i za kvantitativno određivanje adrenalina u farmaceutskim preparatima predložene su različne reakcije boja, koje se najčešće osnivaju na oksidativnoj razgradnji adrenalina.

Za identifikaciju adrenalina služe se farmakopeje obično reakcijom s ferikloridom i amonijakom (4). Ph. Jug. 1933. je osim ove uvrstila i reakciju s jodom i kalijevim hidroksidom, koja se osniva na stvaranju i razgradnji adrenchroma (5): »Kad se nekoliko kapi (preparata) razblaži s malo vode i zakuva s kapi rastvora joda, oboji se crveno kao višnja, a kad se zatim doda rastvora kalijeva hidroksida prelazi crvena boja u zelenu.«

Pri oksidaciji adrenalina spomoću joda teče proces razgradnje različno, već prema tome, da li se izvodi u kiseloj, neutralnoj ili u alkalnoj otopini (6): U neutralnoj ili slabo kiseloj otopini stvara se najprije o-kinon adrenalina, a zatim adrenohrom (N-metil-3-oksi-2,3-dihidroindol-5,6-kinon), produkt crvene boje (7). Ako se reakcija izvodi u alkalnoj otopini, nastaje produkt žute boje, kojega sastav nije poznat.

Svojstva nastalih produkata, kao i tok oksidacije pri ovoj reakciji, znatno su zavisni o pH (6). U jako kiseloj otopini oksidacija adrenalina spomoću joda teče sporo, u slabo kiseloj brže, dok se u alkalnoj otopini adrenohrom brzo razgrađuje i otopina se oboji žuto. Već prema pH reakcijske smjese nastaju produkti različitih nijansa i dubina boja, od ljubičaste do izrazito crvene. Prema Büchiju i Hörleru (6) nastupa pri običnoj temperaturi reakcija odmah pri pH 7,1—7,3. Pritom je za stabilizaciju nastalog produkta potrebno da otopina sadržava etanola. Optimum za oksidaciju adrenalina s obzirom na maksimum obojenja nalazi se prema Marquartu, Graefe-u i Basarrewitschu (8) pri pH 6.

Za kvantitativno određivanje adrenalina u farmaceutskim preparatima predložene su kolorimetrijske odnosno fotometrijske metode, koje se također temelje na reakciji stvaranja adrenohroma. Među njima se ističe fotometrijska jod-metoda od Büchija i Hörlera (6). Ovom se metodom mogu odrediti male količine adrenalina (0,1—1 mg) pa i u smjesi s reduktivnim supstancijama kao i s lokalnim anestetikima (na pr. s prokainovim hidrokloridom i srodnim preparatima). Za izvedbu određivanja potreban je fotometar, a uvjet za ispravne rezultate prilično je usko ograničena koncentracija vodikovih iona (a postizava se dodavanjem 0,2 m  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ).

Međutim, pri ispitivanju otopina adrenalina u praksi bio bi od koristi i takav postupak, kojim bi bilo moguće na brz i jednostavan način, a bez posebne aparature, bar približno ispitati vrijednost preparata adrenalina ili im približno odrediti sadržaj.

U tu svrhu pokušali smo iskoristiti navedenu reakciju s jodom. Ispitivali smo one tipove reakcija, koji su nam se u tu svrhu činili najpogodnijima. To su oni, koji se osnivaju na osjetljivosti reakcije, na maskiranju reakcije (9) kao i oni koji se osnivaju na brzini razgradnje obojenog produkta.

Za ispitivanja upotrebili smo 0,1% otopinu adrenalina u obliku hidroklorida pripremljenu iz Adrenalinum puriss. (»Merck«) prethodno osušenog nad sumpornom kiselinom. Kap ove otopine (0,05 ccm) sadržava dakle 0,05 mg adrenalina.

**Osjetljivost reakcije s jodom na adrenalin.** Za osjetljivost te reakcije — kao i za reakcije boja na adrenalin uopće — navodi se u literaturi granična koncentracija  $1:3 \cdot 10^5$ — $4 \cdot 10^5$  (10). Međutim smo ustanovili da je osjetljivost ove reakcije veća. Ako se kap 0,1% otopine adrenalina pomiješa sa 2—3 ccm vode i doda kap 0,1 n J, smjesa se u toku 3—5 minuta oboji jasno narančasto-crveno. Ružičasta boja, koja potječe od adrenohroma, a maskirana je žutom bojom joda, dolazi do izražaja tek onda, pošto se višak joda ukloni spomoću natrijeva tiosulfata. Zamjetljiva blijedo ružičasta boja opaža se u nazočnosti 0,01 mg adrenalina u 20 ccm otopine u epruveti (16/16), ako se doda kap 0,1 n J i nakon 5 minuta nekoliko kapi 0,1 n  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ . Prema tome je uz ove uvjete granična koncentracija  $1:2 \cdot 10^5$ .



**Ispitivanja na temelju osjetljivosti reakcije.** Povezivanjem ove identitetne reakcije s prosuđivanjem vrijednosti može se uz pomoć granične reakcije ustanoviti i približna valjanost preparata. Ako se kap 0,1% otopine adrenalina (0,05 ccm) u epruveti (16/16) pomiješa s nekoliko ccm vode, pa doda kap 0,1 n J i nakon 4—5 minuta 2—3 kapi 0,1 n  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ , smjesa se oboji jasno ružičasto. Razrijedi li se nakon toga vodom na 20 ccm, reakcijska smjesa mora, kad se promatra duž osi epruvete, biti jasno ružičaste boje, a još slabo ružičaste boje, ako se promatra sa strane prema bijeloj podlozi. Ako se pak 4 ccm reakcijske smjese razrijedi vodom na 20 ccm, zapaža se još blijedo ružičasta boja promatranjem duž osi epruvete prema bijeloj podlozi, a kad se promatra sa strane, čini se praktički da je bezbojna.

**Ispitivanja na temelju maskiranja reakcije.** Ako se u naprijed opisanom pokusu višak joda ne poveže spomoću tiosulfata, žuta boja joda maskira ružičastu boju, koja potječe od adrenohroma, ako je količina adrenalina bila dovoljno mala.

Pokušali smo ispitati uvjete, uz koje bi se ovako maskirana reakcija mogla iskoristiti za brzo prosuđivanje vrijednosti solucija adrenalina.

Ispitivanja smo izvodili u slabo kiselim i u slabo bazičnim otopinama. Pokazalo se, da je za maskiranje ove reakcije s jodom povoljna slabo bazična otopina, osobito ako se kao test upotrebi otopina joda. Ako se naime kap 0,1% otopine adrenalina pomiješa sa 20 ccm vode, doda kap 10% otopine dinatrijeva fosfata i kap 0,1 n J, smjesa ostaje u roku od 5 minuta žute boje kao i usporedna otopina joda (20 ccm vode + kap otopine  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  + kap 0,1 n J). Pritom je dakle boja oksidacijskog produkta posve maskirana bojom joda. Izvede li se na isti način ispitivanje sa 2 kapi 0,1% otopine adrenalina, nastaje za vrijeme od 5 minuta izrazita ljubičasta boja.

Ispitivanja smo izvodili promatranjem boje duž osi epruvete prema bijeloj podlozi uz pomoć navedene usporedne otopine joda uz iste uvjete. Rezultati su navedeni u tablici 1.

**Ispitivanja na temelju razgradnje obojenog produkta.** Budući da je pri reakciji na adrenalin s jodom brzina stvaranja kao i brzina razgradnje adreno-

TABLICA 1.

| Adrenalin |                | Boja smjese 5 minuta nakon izvedbe reakcije |                                           |                                     |                                           |
|-----------|----------------|---------------------------------------------|-------------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------------|
|           |                | —                                           |                                           | + otopina $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ |                                           |
| u mg      | ccm 1% otopine | —                                           | + 0,1 n $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ | —                                   | + 0,1 n $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ |
| —         | —              | žuta                                        | bezbojna                                  | žuta                                | bezbojna                                  |
| 0,025     | 0,025          | žuta                                        | blijedo ružičasta                         | žuta                                | blijedo ljubičasta                        |
| 0,05      | 0,05           | žuto-narančasta                             | svijetlo ružičasta                        | žuta                                | svijetlo ljubičasta                       |
| 0,1       | 0,1            | crveno-smeđa                                | ružičasto-crvena                          | crvenoljubičasta                    | ljubičasta                                |



hroma u bazičnoj otopini zavisna o pH, pokušali smo ispitati uvjete, uz koje bi se brzina razgradnje adrenohroma u takvoj otopini mogla iskoristiti za približno prosuđivanje vrijednosti otopina adrenalina.

Ako se nakon dodatka joda reakcijskoj smjesi umjesto natrijeva tiosulfata doda natrijev hidroksid, gubi se ubrzo boja joda i boja adrenohroma. Doda li se umjesto natrijeva hidroksida koja slabija baza, gubi se crvena boja adrenohroma polaganije. Tada je dakle brzina reakcije razgradnje adrenohroma manja, a zavisna je o količini nazočnog adrenalina, odn. adrenohroma i o pH.

Ispitivali smo utjecaj slabijih baza na razgradnju adrenohroma, kojima bi bilo moguće ukloniti ne samo višak joda nego i djelimice u izvjesnom vremenu razgraditi adrenohrom. Time bi vjerojatno bilo moguće postići i jasniju razliku u boji između dviju otopina s različitim sadržajem adrenalina.

Kap 0,1% otopine adrenalina razrijedi se u epruveti (16/16) sa 2—3 ccm vode, doda kap 0,1 n J i smjesa, nakon 4—5 minuta, razrijedi vodom do 10 ccm. Ako se zatim doda kap n  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  i promiješa, oboji se kratkotrajno ružičasto: Boja se gubi u toku od neko pola minute, a zapaža se promatranjem duž osi epruvete, dok se u prolaznom svijetlu prema bijeloj podlozi čini gotovo bezbojna. Izvede li se ispitivanje sa 2 kapi iste otopine (0,1 ccm = 0,1 mg adrenalina), nastaje jasna ružičasta boja, koja se gubi tek nakon 2—3 minute, a opaža se u prolaznom svijetlu.

Otopine adrenalina slabijih koncentracija daju u oba pokusa negativnu, a jačih koncentracija u oba pokusa pozitivnu reakciju. Stoga je moguće kod takvih otopina razrjeđivanjem odnosno uzimanjem veće količine, prosuđiti približno i količinu adrenalina.

Budući da je brzina razgradnje adrenohroma zavisna o pH, od važnosti je količina natrijeva karbonata, koja se reakcijskoj smjesi dodaje, pa je stoga potrebno da se uzima normalna kap (0,05 ccm) otopine adrenalina i da se doda normalna kap otopine natrijeva karbonata (a stijenke epruvete da se isperu vodom kojom se smjesa razrjeđuje).

U tablici 2. navedeni su rezultati ispitivanja otopina s različitim sadržajem adrenalina.

Naprijed navedeni postupci ispitivanja približne vrijednosti otopina adrenalina mogu poslužiti u svrhu brzog orijentacijskog ispitivanja. Osim toga pokušali smo ispitati uvjete u svrhu približnog kolorimetrijskog određivanja

TABLICA 2.

| Adrenalina<br>u mg | Otopina adrenalina |                       | Boja reakcijske smjese:                            |
|--------------------|--------------------|-----------------------|----------------------------------------------------|
|                    | ‰                  | ccm                   |                                                    |
| 0,05               | 0,1<br>1,0<br>2,0  | 0,50<br>0,05<br>0,025 | bljedilo ružičasta — gubi se nakon<br>cca ½ minute |
| 0,1                | 0,1<br>1,0<br>2,0  | 1,00<br>0,10<br>0,05  | ružičasta — ostaje 2—3 minute                      |

adrenalina uspoređivanjem dobivene boje s usporednom otopinom bez posebne aparature, prostim okom. Ph. Dan. IX. (3) propisuje kod preparata adrenalina ispitivanje vrijednosti na osnovu reakcije s jodom uz dodatak natrijeva tiosulfata u nazočnosti natrijeva fosfata. Otopine koje služe za uspoređivanje boje sastoje od kobaltova nitrata, kuprisulfata, feriklorida i klorovodične kiseline. Propisuje se gornja i donja granica boja uz pomoć dviju usporednih otopina, ali se ne navodi, kojem sadržaju adrenalina odgovaraju navedene boje.

**Pokušaji približnog kolorimetrijskog određivanja adrenalina u otopinama.** Uz naprijed navedene uvjete, boja je pri reakciji s jodom približno proporcionalna koncentraciji adrenalina u otopini. Stoga smo pokušali približno odrediti adrenalin u otopinama uspoređivanjem boje reakcijske smjese u graduranim epruvetama odnosno cilindrima s otopinom adrenalina poznatog sadržaja.

Ispitivanja smo izvodili ovako:

Otopina koja se ispituje, stavi se u bezbojnu graduiranu epruvetu ili u cilindar od 20 ccm spomoću pipete ili mikropipete (već prema količini otopine) i razrijedi s otprilike 10 ccm vode. Zatim se otopini doda kap 0,1 n J, a nakon 5 minuta 2 kapi 0,1 n  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  pa smjesa dopuni vodom do 20 ccm i pomiješa. Kao usporednu probu upotrebili smo boju koja nastaje pri reakciji izvedenoj na isti način sa 0,05 mg čistog adrenalina, dakle s količinom koja odgovara 1 kapi (= 0,05 ccm) 0,1% otop. adrenalina. Prepokusom je potrebno ustanoviti količinu otopine adrenalina što se ispituje, koja pri reakciji daje nešto jaču boju od one kod usporedne probe.

Da bi se postigla veća točnost, uputno je da se razrjeđivanjem s vodom prirede razrjeđenije otopine. Za usporednu otopinu razrijedi se 1 ccm 0,1% otopine adrenalina do 50 ccm i uzme za ispitivanje 2,5 ccm tako razrjeđene otopine (= 0,05 ccm 0,1% otopine). Na isti se način priredi i razrjeđenija otopina preparata adrenalina koji se ispituje.

Od reakcijske smjese otopine koja se ispituje odlije se ili izvuče spomoću pipete toliko, dok se ne postigne boja koja je jednaka onoj usporedne otopine. Boje se uspoređuju promatranjem duž osi epruveta (cilindra) prema bijeloj podlozi.

$$\text{Količina adrenalina } \% = \frac{1}{a \cdot b}$$

**a** = ccm otopine adrenalina koja se ispituje; **b** = ccm reakcijske smjese pošto se odlijevanjem postigne jednaka boja s usporednom otopinom.

U tablici 3. navedeni su rezultati dobiveni očitavanjem na 0,5 ccm za otopine adrenalina različitih koncentracija. Uzeta je srednja vrijednost od 5 očitavanja.

Kako se iz rezultata u tablici 3. vidi, može se na ovaj jednostavan način uz nešto vježbe, u dovoljno razrijeđenim otopinama adrenalin odrediti dosta točno — ± 0,01% — ako je volumen reakcijske smjese koji se očitava iznad 10 ccm.

Ovaj bi se postupak mogao primijeniti na pr. na ispitivanje i kontrolu 0,1 % otop. adrenalina na ovaj način: 0,5 ccm preparata razrijedi se vodom do 25 ccm. 3 ccm ovako razrijeđene otopine (= 0,06 ccm 0,1% otop. adrenalina)

TABLICA 3.

| a        | b        | Količina adrenalina u ‰ |        | Razlika u ‰ |
|----------|----------|-------------------------|--------|-------------|
|          |          | izračunana              | nađena |             |
| 0,25 ccm | 16,5 ccm | 0,25                    | 0,24   | — 0,01      |
| 0,20 "   | 14,5 "   | 0,34                    | 0,34   | ± 0,00      |
| 0,10 "   | 13,5 "   | 0,73                    | 0,74   | + 0,01      |
| 0,30 "   | 9,5 "    | 0,34                    | 0,35   | + 0,01      |
| 0,20 "   | 6,5 "    | 0,73                    | 0,77   | + 0,04      |
| 0,30 "   | 5,0 "    | 0,73                    | 0,67   | — 0,06      |

pomiješa se u graduiranoj epruveti (cilindru) od 20 ccm sa 1 kapi 0,1 n J, a nakon 5 minuta doda 2 kapi 0,1 n  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  i smjesa razrijedi vodom do 20 ccm. Ako se dozvoljava, da količina adrenalina u otopini varira između 0,95—1,05‰, znači, da 15,9 ccm reakcijske smjese ne smije biti jače boje, a 17,4 ccm ne smije biti slabije boje od usporedne otopine.

Razumljivo je da pri ovom ispitivanju moraju epruvete odn. cilindri, u kojima se ispitivanja izvode, biti jednakog priječnika.

Adrenalin koji se upotrebljava za pripremu usporedne otopine mora biti čist. No mjesto adrenalina može se upotrebiti kao usporedna otopina i smjesa otopina priređena od kobaltklorida, kuprisulfata i feriklorida u klorovodičnoj kiselini ili drugih kemikalja, kojih se miješanjem može prirediti boja, koja odgovara boji reakcijske smjese, dobivene sa 0,05 mg čistog adrenalina u volumenu od 20 ccm.

### Zaključak

Na temelju reakcije na adrealin s jodom, pri kojoj nastaje adrenchrom, produkt crvene boje, moguće je uz pomoć osjetljivosti i maskiranja ove reakcije, kao i na temelju brzine razgradnje obojenog produkta, brzo presuditi približnu vrijednost razrijeđenih otopina adrenalina.

Reakcija na adrenalin s jodom može poslužiti i za brzo približno kolorimetrijsko određivanje adrenalina bez posebne aparature. U graduiranoj epruveti (cilindru) od 20 ccm doda se povoljno razrijeđenoj otopini adrenalina kap 0,1 n J, a nakon 5 minuta, 2 kapi 0,1 n  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ , pa smjesa zatim razrijedi vodom do 20 ccm i pomiješa. Od reakcijske smjese odlije se (izvuče pipetom) toliko, da se postigne boja jednaka usporednoj otopini. Otopina za uspoređivanje pripremi se reakcijom izvedenom na isti način sa 0,05 mg čistog adrenalina.

$$\text{‰ adrenalina} = \frac{1}{a \cdot b}$$

a = ccm otop. adrenalina, b = ccm reakcijske smjese.

Kod povoljno razrijeđenih otopina adrenalina može se postići točnost mjerenja ±0,01‰.



# Über einige Möglichkeiten schneller Wertbestimmung von Adrenalinlösungen

Von D. Barković und V. Fintić

## Zusammenfassung

Bei der Einwirkung von Jod auf Adrenalin entsteht ein rot gefärbtes Produkt Adrenochrom. Die Empfindlichkeit und Maskierung dieser Reaktion, sowie die Zersetzungsgeschwindigkeit des gefärbten Produktes gestatten es, den annähernden Wert verdünnter Adrenalinlösungen schnell zu schätzen.

Die Jodreaktion auf Adrenalin kann auch für schnelle annähernde kolorimetrische Gehaltsbestimmungen von Adrenalinlösungen ohne besondere Apparatur benützt werden. In einem Messzylinder von 20 ccm Rauminhalt wird der genügend verdünnten Adrenalinlösung 1 Tr. 0,1 n J, und nach 5 Minuten 2 Tr. 0,1 n  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  zugefügt. Man verdünnt sodann die Mischung mit Wasser auf 20 ccm und schüttelt um. Nachher wird vom Reaktionsgemisch so viel abgegossen (oder mit einer Pipette abgehoben) bis die Farbe der Vergleichslösung erreicht wird. Die Vergleichslösung bereitet man mit Hilfe einer in gleicher Weise ausgeführten Reaktion mit 1 Tr. 1% Adrenalinlösung, welche aus reinem Adrenalin hergestellt wurde.

$$\% \text{ Adrenalin} = \frac{1}{a \cdot b}$$

wobei  $a$  = ccm der Adrenalinlösung,  $b$  = ccm des Reaktionsgemisches bedeutet.

Die Genauigkeit beträgt bei günstig verdünnten Lösungen  $\pm 0,01$  %.

## Literatura

1. Ph. Helv. V. 863 (1933). — 2. U. S. P. XIII. 199 (1947). — 3. Ph. Dan. Ed. IX. II. 54, III. 108 (1948). — 4. Vulpian. Compt. rend. 43, 663 (1865). — Krukenberg, Virchows Arch. 101, 542 (1885) — cit. L. Ekkert. Erkennung organischer Verbindungen. Stuttgart (1935), 156. — 5. Ph. Jug. 29 (1933). — 6. J. Büchi i Th. Hörler, Pharm. Acta Helv. 22, 575 (1947) — I. Ehrlén, Farm. Revy 47, 521 (1948). — 7. D. Green i D. Richter, Biolog. J. 31. 699 (1937) — cit. J. Büchi i Th. Hörler, Pharm. Acta Helv. 22, 577 (1947). — 8. P. Marquart, L. Graefe i T. Basarewitsch, Pharmazie I, 13 (1946). — 9. F. Feigl, Qualitative Analyse mit Hilfe von Tüpfelreaktionen. Leipzig, III. Aufl. (1938), 36. — 10. N. C. Borberg, Scand. Arch. Physiol. 27. 341 (1912) — cit. J. Büchi i Th. Hörler, Pharm. Acta Helv. 20, 275 (1945).

mr. Ante Franceschi:

## Fotometrijska metoda za određivanje kreatinina u krvi i mokraći

(Primljeno 17. VI. 1951.)

Već dulje vremena nastojao sam pronaći preciznu metodu za određivanje kreatinskih tijela u krvi i mokraći, jer sam sumnjao u rezultate dobivene uobičajenim metodama, kojima se služimo u kliničkom laboratoriju.

Metoda Neubauera i Salkowskoga, kojom se određuju kreatininska tijela već je zastarjela. Folin je izradio metodu na temelju Jaffe-ove reakcije i ona se danas najviše upotrebljava. Postoje različne modifikacije originalne Folinove metode, kojima se kreatininska tijela određuju kolorimetrijski i fotometrijski. Različni medic. kemičari nalaze da ova metoda ne odgovara, jer u prvom redu pikrinska kiselina, koja je žute boje prelazi s alkalijama u crvenonarančastu,