

Megjegyzések a Balázs-féle fenolos cukormeghatározási módszerhez

BORISSZA FERENC és SZÁSZ KÁLMÁN

Balatonaligai Állami Gazdaság Laboratóriuma, Balatonaliga

A térfogatos cukormeghatározási módszerekkel szemben nálunk is egyre inkább tért hódítanak a kolorimetrikus eljárások. Ez utóbbiak több szempontból is előnyösebbeknek látszanak: 1. kisebb mennyiségű anyaggal végezhető, 2. gyorsabbak és 3. kevésbé érzékenyek a vizsgálati körülmények esetleges változásaira. A kolorimetrikus meghatározási módszerek közül az antront felhasználók az ismertebbek [4, 5, 6, 7, 8]. DUBOIS és munkatársai rövid, részletes leírást nem adó közlése [2] nyomán BALÁZS dolgozott ki 1953-ban fenollal történő fotometrikus mikro-eljárást cukrok mennyiségi meghatározására [1]. A módszert SZALAI és FRENÝÓ 1962-ben megjelent praktikuma is ismerteti [11]. DUBOIS és munkatársai azóta újabb eredményekről referáltak [3]. Módszerüket nemrég a Szovjetunióban papírkromatografiás úton szétválasztott cukrok mennyiségi meghatározására használták [10]. Mivel a második Dubois cikkben leírt módszer több vonatkozásban eltér Balázsétól, és ugyanakkor annál előnyösebben alkalmazhatónak látszik, megvizsgáltuk mennyiben indokolt a Balázs-féle meghatározás néhány előírásának betartása.

Anyag és módszer

Vizsgálatainkhoz pss. tisztaságú glükózt, p. a. fenolt és p. a. cc kénsavat használtunk. A fenolt felhasználás előtt átdestilláltuk és így mindvégig színtelen fenollal dolgoztunk.

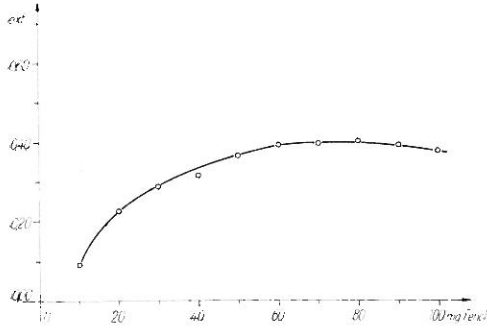
Vizsgálatainkat kalibrációs görbék felvételével kezdtük. A görbéket Dubois szerint, illetve a Balázs által leírtaknak megfelelően vettük fel. Az értékelés alapján az így felvett görbék közti különbség szolgált.

A méréseket FM—56 típusú fotométeren végeztük M₅₀-es szűrő mellett. Az alkalmazott küvetta rétegvastagsága 1 cm volt. A leolvasásokat sötét helyiségben végeztük.

Kísérleti rész

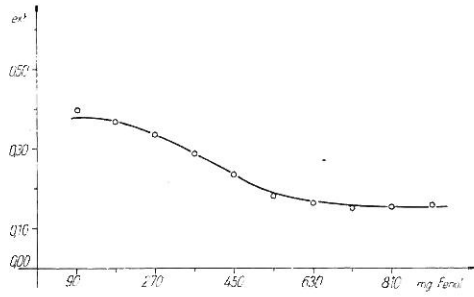
Balázs 1 ml cukoroldathoz 1 ml 90⁰/₀-os fenolt és 3 ml cc kénsavat adott. Dubois ezzel szemben 2 ml cukoroldathoz 1 ml 5⁰/₀-os fenolt és 5 ml cc kénsavat alkalmazott. A cukoroldat mennyiségét máshol Dubois 1—2 ml-nek írja. Így nem ragaszkodhatunk a 2 ml-hez, hanem 1 ml cukoroldatot használtunk mintánként. Ez esetben ugyanis meredekebb görbét kaptunk és a végső térfogat még mindig elegendőnek bizonyult az 1 cm-es küvetta kitöltéséhez. Használhatóbb volt számunkra ez a változat azért is, mert így gyakorlatilag ugyanolyan végső kénsav koncentrációt kaptunk, mint Balázs.

A két módszer az adagolt fenol mennyiségében tér el lényegesen. A szín kialakulásának a fenol mennyiségétől való függését két görbe felvétele során vizsgáltuk. Cukrot használtunk mérőoldatként és a fenol mennyiségét változtattuk. A mérőoldatunk 50 γ cukor volt 1 ml deszt. vízben. A fenol mennyiségét 10—100 mg, illetve 90—900 mg között változtattuk. A végső térfogat minden esetben 7 ml volt. A mérési eredményeket az 1. és 2. ábra szemlélteti. Látható, hogy 10—70 mg-ig növekvő fenolmennyiség hatására a kialakult szín intenzitása nő, 80 mg-on felül csökken. A csökkenés 600 mg-ig nagyobb mérvű, azután a görbe ellaposodik.



1. ábra

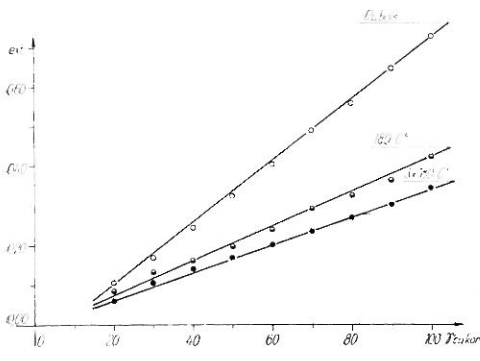
Változó fenolmennyiség hatása a meghatározás során kialakult szín intenzitására



2. ábra

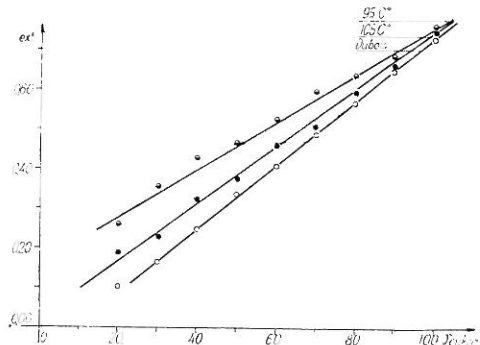
Fenolfölösleg hatása a meghatározás során kialakult szín intenzitására

A továbbiakban Balázs a cukor—fenol—kénsav keveréket enyhe gyöngyözésig melegítette. Dubois ilyesmiről nem ír. A melegítés hatásának vizsgálatára kalibrációs görbéket vettünk fel glükózzal, amikor is 1 ml cukoroldathoz 1 ml 50%-os fenolt és 5 ml cc kénsavat adtunk. Három sorozatot mértünk: egyet melegítés nélkül, egyet-egyed enyhe gyöngyözésig melegítettünk (kb. 180 C°) és egyet háromszor melegítettünk fel erre a hőmérsékletre. A kapott görbéket a 3. ábra



3. ábra

A Balázs által ajánlott melegítés, valamint annak háromszori ismétlésének hatása Dubois eljárásához hasonlítva

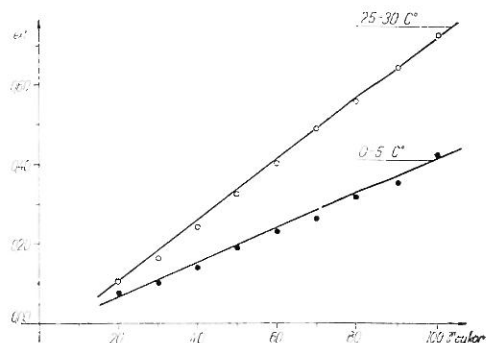


4. ábra

95 és 105 °C-os hőkezelés hatása a színelmélyülésre Dubois eljárásához viszonyítva

szemlélteti. Az ábráról leolvasható, hogy melegítés hatására a kialakult szín intenzitása csökkent. Ismételt melegítés további színgyengülést eredményezett.

Tudomásunk szerint ezt a melegítést nálunk nem is alkalmazzák. Ehelyett szárítószekrényben 105°C -on vagy vízfürdőben $90\text{--}95^{\circ}\text{C}$ -on tartják meghatározott ideig a cukor—fenol—kénsav keveréket. Az említett kezelések hatását is megfigyeltük. Méréseink eredményét a 4. ábra szemlélteti. A mindkét esetben előráig tartó hőkezelés hatására megfigyelhető elsősorban a kis cukortartalmaknál kialakult szín elmélyülése.



5. ábra
Alacsony hőmérséklet hatása a mérhető extinkcióra

Dubois és munkatársai a leolvasás előtt vízfürdőben $25\text{--}30^{\circ}\text{C}$ -ra állították be a mérendő anyagot. Ennek szükségességét kívántuk lemérni azzal, hogy $0\text{--}5^{\circ}\text{C}$, valamint $50\text{--}55^{\circ}\text{C}$ -on is vettünk fel kalibrációs görbéket. A magasabb hőmérséklet hatására az extinkciós értékek nem változtak, míg alacsonyabb hőmérsékleten csökkentek. A mérési eredményeket az 5. ábra szemlélteti.

Eredmények és értékelés

A cukor mérőoldattal végzett fenolmérési sorozatainkból megállapítható, hogy ha maximális színintenzitást akarunk elérni $50\ \mu$ mérendő cukor esetében, akkor $70\text{--}90\ \text{mg}$ fenolt kell reagensként adagolnunk. Figyelembe véve azt, hogy a fenol $1:15$ arányban oldódik vízben, érthető, hogy Dubois választása az 50% -os oldatra esett. Ebből még nem válik ki a fenol, a mérés érzékenysége pedig már itt is kielégítő. Nem mondható el ez a Balázs által ajánlott 90% -os oldatról. Igaz, hogy ebből sem kristályosodik ki a fenol, a reakció érzékenysége viszont minimumban van. Balázs szerint kevés fenol jelenlétében a szín kialakulása nem teljes, fenolfölösleg azonban a reakciót nem zavarja. Megállapításának első része az 1. ábrán feltüntetett tartományra, második része pedig a 2. ábra görbéjének végső részén látszik igazoltnak.

Dubois és munkatársai szerint, akik $10\text{--}150\ \text{mg}$ fenolmennyiség között végeztek méréseket, a fenolmennyiségnek növelése eltolhatja az elnyelési maximum helyét. Ezzel megegyező STRAUB [9] közlése, miszerint a koncentráció megváltoztatásával egyidejűleg megváltozhat a színes anyag és az egyéb önmagukban nem abszorbeáló molekulák kölesönhatása, és ez az elnyelési sávok helyzetének és nagyságának megváltozását eredményezi. Ennek ellenőrzésére a ren-

delkezésünkre álló fotométerrel nem volt lehetőségünk, a görbe végén mért alacsony értékeket mindenesetre magyarázhatja.

A Dubois által leírt és általunk is kedvezőnek talált 5%-os fenolt alkalmazó módszer amellett, hogy érzékenyebb, jóval kevesebb fenolt is fogyaszt, mint Balázsé.

A Balázs által ajánlott gyöngyözésig való melegítés hatására bekövetkezett színgyengülést a kénsav dehidratáló hatására kialakult furfurool származék (esetünkben oximetilfurfurool) bomlása magyarázhatja (oximetilfurfurool—levulinsav + hangyasav). Ennek a reakcióútnak valószínűségét látszik alátámasztani az, hogy háromszori melegítés hatására további színgyengülést tapasztaltunk az egyszeri melegítéshez képest. Megjegyzendő, hogy a háromszori melegítés hatására már szénkiválás volt megfigyelhető. Figyelembe véve az elmondottakat, ezt a melegítést, amely a szín elmélyülését volna hivatott kiváltani, méréseink alapján nem ajánlhatjuk.

A 95 és 105° C-os hőkezelés hatására bekövetkezett színelmélyülés megfelel Balázs elképzelésének, de máshol jelentkezik, mint ahol ő várta és jelezte. Az eljárás alkalmazása azonban nem veszélytelen. A módszer 10 γ cukorra már érzékenyen reagál, ami előnyéül szolgál, de ebből adódik az is, hogy szénhidrát-tartalma szennyeződések nagymértékben csökkentik a reprodukálhatóság esélyét. Ha a jelzett hőmérsékleten akárcsak félórát is tartjuk a keveréket, optimális körülményeket biztosítunk a bekerült szennyeződések (itt elsősorban a cellulóz tartalmú anyagokra gondolunk) tökéletes hidrolizálására. Vizsgálataink során ilyenkor kaptuk a legnagyobb szórást a paralellek között, de a görbe adatainak vonatkozásában is. Kérdéses, hogy a nagyobb szóródás kedvezőtlen hatását ellensúlyozni tudják-e az így leolvasott magasabb értékek. Vizsgálataink alapján nem látjuk indokoltnak e hőkezelés beiktatását. Dubois talán ezt igyekszik helyettesíteni azzal, hogy a kénsavat, ellentétben Balázs ajánlatával, gyorsan (10—20 sec) adja a cukor és fenol elegyéhez, miközben a sav sugarát a folyadék felszínére irányítja.

STRAUB [9] szerint hőmérsékletváltozás hatására eltolódik az elnyelési sávok helye. Dubois és munkatársai feltehetően ezt a hibalehetőséget kívánták kizárni azzal, hogy minden mérés előtt adott hőmérsékletre állították be mintáikat. Az alacsony hőmérséklet extinkciós értékeket csökkentő hatását mi is tapasztaltuk, így a mérés kori hőmérséklet rögzítése indokoltnak látszik.

A kialakult szín intenzitása Dubois szerint szokatlanul állandó. Balázs öt heti tárolás hatására sem tapasztalt változást, ha a kémcsöveket bedugaszolta. Ha mintáinkat üveg dugós kémcsövekben tudjuk tárolni, és így megakadályozzuk a később bekövetkező szennyeződést, a leolvasásokat később is elvégezhetjük. Ez a lehetőség is a módszer előnyei közé tartozik.

Összefoglalás

Vizsgálataink során összehasonlítottuk a Balázs által kidolgozott, valamint Dubois és munkatársai 1956-ban közölt fenolos cukormeghatározási módszerét. Megállapításaink különbözőképpen felvett kalibrációs görbék összevetésén alapulnak. A Balázs-féle módszer kritikáját röviden a következőkben adhatjuk meg:

1. A 90%-os fenol használatát nem látjuk kellően megalapozottnak. Ez indokolatlanul nagy mennyiségű fenol fogyasztását jelenti, de a reakció érzékenységet is csökkenti. Ehelyett Dubois nyomán 5%-os vízes fenololdat alkalmazását ajánlhatjuk.

2. A Balázs által leírt enyhe gyöngyözésig való melegítés a kialakult oximetilfurfurof bomlását eredményezi, így hatására nemhogy mélyülne, de éppen a szín. Alkalmazása éppen ezért mellőzendő.

3. Az ehelyett alkalmazott 95 vagy 105 C°-os hőkezeléssel a kialakult szín elmélyíthető. Ez az eljárás azonban a leovasható értékek nagyobb szórását is eredményezi, így használata nem látszik indokoltnak.

4. Mivel a mérés kori hőmérséklet hatással van a mérhető extinkció nagyságára, Dubois után a leolvasáskori hőmérsékletnek 25—30 C° között való tartását ajánljuk.

5. Ha mintáinkat üveg dugós kémcsövekben tudjuk tárolni, akkor a leolvasásokat később, a meghatározás után több nap múlva is elvégezhetjük.

Végül Dubois nyomán közöljük a legelőnyösebbnek talált eljárás rövid leírását: 1 ml vízes cukorkivonatot, amely 20—100 γ cukrot tartalmaz, tűzálló kémcsőbe pipettázunk, majd 1 ml 5%-os vízes fenololdatot adunk hozzá. A kémcső tartalmát összerázzuk és 5 ml cc kénsavat engedünk bele, úgy hogy a sav sugarát a folyadék felszínére irányítjuk. A kénsav hozzáadása 10—20 sec alatt történjék meg. Összerázás után hagyjuk szobahőmérsékletre hűlni mintáinkat. Leolvasás előtt 25—30° C-ra állítsuk be az anyagot vízfürdőben. A leolvasásokat 490 m μ abszorpciós maximummal rendelkező szűrővel, illetve ezen a hullámhosszon végezzük. A cukor mennyiségének meghatározása előzetesen felvett kalibrációs görbe segítségével, vagy a Bouguer—Beer törvény felhasználásával történhet.

Érkezett: 1963. február 19.

Irodalom

- [1] BALÁZS, O.: Fotometriks mikro-eljárások cukor és foszfor gyors meghatározására nagy sorozatvizsgálatot igénylő erjesztési kísérleteknél. Magyar Kémiai Folyóirat. **59.** 70—77. 1953.
- [2] DUBOIS, M., GILLES, K., HAMILTON, J. K., REBERS, P. A. & SMITH, F.: A colorimetric method for determination of sugars. Nature. **168.** 467. 1951.
- [3] DUBOIS, M., GILLES, K. A., HAMILTON, J. K., REBERS, P. A. & SMITH, F.: Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem. **28.** 350—356. 1956.
- [4] FELFÖLDY, L. & KALKO, Zs.: Cellulózbontás mértéke a Balaton különböző biotópjaiban és annak mérése anthron reagenssel. Ann. biol. Tihany. **25.** 209—215. 1958.
- [5] FÖLDES, J.: Összehasonlító vizsgálatok anthron reagenssel polysaccharidák meghatározására és jellemzésére. Kísérletes Orvostudomány. **11.** 1—5. 1959.
- [6] MÁRKUS, LNÉ.: Szénhidrátok meghatározása növényi anyagokban antron reagenssel. I. Agrokémia és Talajtan. **3.** 227—234. 1954.
- [7] MÁRKUS, LNÉ.: Szénhidrátok meghatározása növényi anyagokban antron reagenssel. II. Cellulózaktivitás mérése talajban és trágyában. Agrokémia és talajtan. **4.** 207—216. 1955.
- [8] PÁNCZÉL, M. & EIFERT, J.: Szénhidrát meghatározási módszerek összehasonlítása és az antronos eljárás alkalmazása szőlővessző cukor és keményítőtartalmának sorozatvizsgálatára. Agrokémia és Talajtan. **10.** 99—110. 1961.
- [9] STRAUB, GY.: Műszeres kémiai analízis eszközei. Tankönyvkiadó, Budapest. 1961.
- [10] SVEDSZKAJA, Z. M. & POPOVA, N. N.: Kolicesztvennoje opredelenije szaharov v rasztitelnom materiale sz pomosesju fenola. Morfogenez rasztenij. II. 527—529. 1961.
- [11] SZALAI, I. & FRENYÓ, V.: Növényélettani Kísérletek. Tankönyvkiadó. Budapest. 1962

Примечание к определению сахаров феноловым методом по Балаж

Ф. БОРИССА И К. САС
Лаборатория госхоза, Балатоналига (Венгрия)

Резюме

После появления в свет статьи Dubois и сотрудников в 1951 году, Балаж разработал фотометрический микрометод для количественного определения сахаров при помощи фенола. В последнее время Dubois опубликовал свои новейшие работы в этой области. Описанный в последних сообщениях метод во многом отличается от метода Балаж и нам кажется, является более пригодным для определения сахаров. Мы хотели проверить обоснованность модификаций, предложенных Балаж.

Для исследований использовали очищенную глюкозу, фенол и концентрированную аналитически чистую серную кислоту. Перед употреблением фенол перодестиллировали. Сопоставляя метод Dubois и Балаж мы сравнивали калибрационные кривые. Измерения проводили фотометром типа FM—56, фильтр M—50, толщина кювет 1 см. Существенная разница двух методов заключается в использовании различных количеств фенола. При установлении количеств фенола необходимого для протекания реакции, мы исследовали зависимость интенсивности окраски от различных концентраций фенола. (рис. 1, 2). На основе полученных данных, нам кажется не целесообразным применять 90% фенол, как предлагает Балаж. Это приводит к использованию нерационально больших количеств фенола и снижению чувствительности реакции. Взамен предлагается применять 5% водный раствор фенола, согласно методу Dubois.

Балаж предлагает нагревать смесь сахара-фенола и серной кислоты до появления пузырьков. Dubois не пишет об этом. Изучая влияние нагревания мы вывели калибрационные кривые без нагревания, с однократным и трехкратным нагреванием (рис. 3). Полученное ослабление окраски объясняется разрушением производных фурфурола, образованного под дегидрационным влиянием концентрированной серной кислоты. (оксиметил-фурфурол → левулиновая кислота + муравьиная кислота). Поэтому нагревание проводить не рекомендуется. Нагревание в течение получаса при температуре 95—105° C дает более интенсивную окраску (рис. 4), но в то же время вызывает большие расхождения, поэтому и такое нагревание проводить не следует.

При низкой температуре (0—5° C) получили величину экстинкции меньше чем при 25—30° C по методу Dubois. При более высоких температурах (50—55) такого эффекта не наблюдалось. Несмотря на это нам кажется обоснованным поддерживать температуру на определенном уровне.

Краткое описание метода определения сахара по Dubois: 1 мл. водного раствора сахара, содержащего 20—10 0у сахара, помещается в огнеупорную пробирку, добавляется 1 мл 5% водного раствора фенола. Содержимое пробирки встряхивается и туда добавляется 5 мл конц. серной кислоты, таким образом, что бы струя кислоты была направлена на поверхность находящегося в пробирке раствора. Прибавление ведется в течение 10—20 секунд. После встряхивания образец охлаждается до комнатной температуры. При измерении температура раствора должна быть в пределах 25—30°. Для измерения необходимо использовать фильтры имеющие абсорбционный максимум 490 μ и, или же необходимо проводить определение при данной длине волны света. Вычисление сахаров проводится при помощи предварительно полученных калибрационных кривых, или же применяя закон Bouguer—Beer.

Рис. 1. Влияние различных количеств фенола на интенсивность окрашивания.

Рис. 2. Влияние избыточного количества фенола на интенсивность окрашивания.

Рис. 3. Сравнение влияния нагревания по Балажу и трехкратного нагревания по методу Dubois.

Рис. 4. Влияние нагревания при 95—105° на интенсивность окрашивания по сравнению с методом Dubois.

Рис. 5. Влияние низких температур на величины экстинкций.

Einige Bemerkungen zur Phenol-Zuckerbestimmungsmethode von Balázs

F. BORISSZA und K. SZÁSZ

Laboratorium des Staatsgutes Balatonaliga (Ungarn)

Zusammenfassung

In Anlehnung an eine im Jahre 1951 erschienene Mitteilung von Dubois und Mitarbeitern entwickelte Balázs eine photometrische Mikromethode zur quantitativen Zuckerbestimmung mit Phenol. Dubois et al. haben seitdem über neuere Resultate berichtet. Da die in ihrem letzteren Artikel beschriebene Methode in mehreren Beziehungen von der Balázsschen abweicht, und gleichzeitig als vorteilhafter anwendbar erscheint, war es angezeigt zu untersuchen, inwieferne die von Balázs mitgeteilten Abweichungen gerechtfertigt sind.

Zu diesen Untersuchungen wurde Glukose psd. Phenol p. a. und cc Schwefelsäure p. a. verwendet. Das Phenol wurde vor der Benützung durchdestilliert. Unsere vergleichende Methode beruhte auf der Gegenüberstellung von nach Dubois bzw. nach Balázs aufgenommenen Kalibrationsdiagrammen. Die Messungen erfolgten mit dem Photometer Typ FM—56 unter Anwendung eines M₅₀-Filters. Die Schichtendichte der verwendeten Küvetten betrug 1 cm.

Zwischen den beiden Methoden besteht ein wesentlicher Unterschied betreffs der Menge des dosierten Phenols. Zur Bestimmung der Menge des zum Ablauf der Reaktion benötigten Phenols wurden Beobachtungen darüber vorgenommen, auf welche Weise die Intensität der ausgebildeten Farbe sich unter der Einwirkung von wechselnden Phenolmengen verändert (Abb. 1. und 2.). Im Besitze der gewonnenen Angaben erscheint uns der Gebrauch des von Balázs empfohlenen 90%igen Phenols nicht entsprechend begründet. Der Vorgang geht nicht nur mit übermäßigem Phenolverbrauch einher, sondern vermindert auch die Empfindlichkeit der Reaktion. An seiner Stelle wird in Anlehnung an Dubois die Verwendung von 50%igen wässriger Phenollösung empfohlen.

Balázs erhitzte die Mischung von Zucker, Phenol und Schwefelsäure bis zum mässigen Perlen. Dubois erwähnt keinen solchen Vorgang. Zur Untersuchung der Wirkung der Erhitzung haben wir Kalibrationsdiagramme ohne Erwärmen, sowie mit einmaligen und dreimaligem Erwärmen angenommen. (Abb. 3.). Die eingetretene Farbenabschwächung lässt sich mit der Zersetzung des unter der Dehydrationswirkung der cc Schwefelsäure entstandenen Furfural-Derivativs erklären (Oxymethylfurfurof-Lävulinsäure + Ameisensäure). Dieses Erwärmen kann daher nicht anempfohlen werden.

Eine halbstündige Wärmebehandlung bei 95 bzw. 105° C hatte die Vertiefung der Farbe zur Folge (Abb. 4). Sie ging aber mit einer grösseren Streuung der Messergebnisse einher und erscheint daher nicht gerechtfertigt.

Bei niedrigeren Temperaturen (0 bis 5° C) wurde eine geringere Extinktion gemessen als bei den in der Methode von Dubois angegebenen Temperaturen von 25 bis 30° C. Bei höheren Temperaturen (50 bis 55° C) wurden solche Wirkungen nicht beobachtet. Trotzdem scheint es angezeigt, die Messtemperatur auf einem konstanten Wert zu halten.

Schliesslich teilen wir nach Dubois die kurze Beschreibung des für vorteilhaftest befundenen Verfahrens mit. Ein wässriger Zuckerextrakt von 1 ml, welcher 20 bis 100 γ Zucker enthält, wird in ein feuerfestes Prüfröhrchen pipettiert und alsdann 1 ml 50%ige wässrige Phenollösung beigegeben. Der Inhalt des Prüfröhrchens wird zusammengesüttelt und 5 ml cc Schwefelsäure zugegeben u. zw. derart, dass der Strahl der Säure auf die Oberfläche der Flüssigkeit gerichtet wird. Die Zugabe von Schwefelsäure soll innerhalb 10 bis 20 Sekunden erfolgen. Nach dem Zusammenschütteln werden die Proben zum Auskühlen bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Vor der Ablesung ist das Material auf 25 bis 30° C einzustellen. Die Ablesungen sind mittels eines Filters mit 490 m μ A bsorptionsmaximum, bzw. bei einem Lichte von dieser Wellenlänge vorzunehmen. Die

quantitative Zuckerbestimmung erfolgt mit Hilfe eines vorher aufgenommenen Kalibrationsdiagramms oder nach dem Gesetz von Bougouer-Beer.

Abb. 1. Die Wirkung von wechselnden Phenolmengen auf die Intensität der während der Bestimmung entstandenen Farbe.

Abb. 2. Die Wirkung von Phenolüberfluss auf die Intensität der im Laufe der Bestimmung entstandenen Farbe.

Abb. 3. Die Wirkung des von Balázs empfohlenen Erwärmens sowie dessen dreimaliger Wiederholung im Vergleich zum Dubois Verfahren.

Abb. 4. Die Wirkung der Wärmebehandlung bei 95 und 105° C auf die Farbvertiefung, im Vergleich mit der Methode von Dubois.

Abb. 5. Die Wirkung von niedrigen Temperaturen auf die messbare Extinktion.