

ÜBER DIE BESTIMMUNG NICHTREDUZIERENDER ZUCKER III.*

VERWENDUNG VON TETRAZOLIUMBLAU UND NEOTETRAZOLIUMBLAU ZUR ZUCKERBESTIMMUNG MIT DER PAPIERCHROMATOGRAPHIE

M. TROJNA und J. HUBÁČEK

*Chemisches Institut,
Landwirtschaftliche Hochschule, Prag-Suchdol*

Eingegangen am 17. November 1971

Es wurde das chromatographisch getrennte Gemisch von D-Glucose, D-Fructose und Saccharose nach enzymatischer Inversion auf Papier mit Ditetrazoliumsalzen in methanolischer Natriumhydroxidlösung detegiert. Nach Entstehung der Diformazane durch Reduktion wurden das überschüssige Detektionsreagens und einige bei der Reaktion anfallende Farbnebenprodukte mit Methanol ausgewaschen. Die Diformazanflecke wurden mit einem Gemisch von N,N-Dimethylformamid und Essigsäure für die spektrophotometrische Auswertung eluiert. Für jeden Zucker wurde ein lineares Eichdiagramm gewonnen, das für kochromatographierte Analysenproben individuelle Gültigkeit aufweist.

Für die Bestimmung reduzierender¹ und nichtreduzierender Zucker²⁻⁴ bewährte sich 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC). Im Vergleich mit einigen anderen Tetrazoliumsalzen ist es als Detektionsreagens weniger empfindlich^{5,6}. Die Ditetrazoliumsalze, deren Molekül aus zwei substituierten Monotetrazoliumsalzen gebildet wird, die in der 3,3'-Stellung mit dem Radikal 4,4'-Diphenyl, fallweise mit einem weiter substituierten Radikal verbunden sind, zeigen für die Detektion eine ungefähr zehnfache Empfindlichkeit.

Wir befaßten uns daher mit der quantitativen chromatographischen Analyse einiger Zucker unter Verwendung von Detektionsreagentien, die auf der Basis von 2,2',5,5'-Tetraphenyl-3,3'-(3,3'-dimethoxy-4,4'-diphenyl)-ditetrazoliumchlorid (Tetrazoliumblau) und 2,2',5,5'-Tetraphenyl-3,3'-(4,4'-diphenyl)-ditetrazoliumchlorid (Neotetrazoliumblau) beruhen.

EXPERIMENTELLER TEIL

Chromatographie. Die Lösung des Zuckermodellgemisches ($5,8 \cdot 10^{-4}$ mol D-Glucose, $1,7 \cdot 10^{-4}$ mol D-Fructose und $7,3 \cdot 10^{-5}$ mol Saccharose in 100 ml 2-Propanol) wurde punktförmig auf die Startlinie von Whatman 4-Papier in Volumina von 5, 10, 20 und 30 μ l aufgetragen. Die Chromatographie wurde mittels absteigender Methode im System 1-Butanol-Essigsäure-Wasser (4 : 1 : 5) durchgeführt. Die Hydrolyse der abgetrennten Saccharose wurde nach

* II. Mitteilung: diese Zeitschrift 34, 2469 (1969).

Besprühen mit 0,4%iger Invertaselösung bei 45°C während einer Stunde enzymatisch durchgeführt⁴.

Detektion. Das Reagens wurde durch Mischen einer 1%igen Lösung von Tetrazoliumblau oder Neotetrazoliumblau (beide Lachema, Brno) im Methanol mit dem gleichen Volumen einer methanolischen 1M-NaOH p.a. unmittelbar vor Gebrauch hergestellt. Die Chromatogramme wurden nach Durchziehen durch das Reagens im kalten Luftstrom getrocknet und im Thermostaten stets eine Stunde in Wasserdampf-atmosphäre erhitzt, und zwar bei der Detektion mit Tetrazoliumblau bei 64°C, bei der Detektion mit Neotetrazoliumblau bei 62°C.

Spektrophotometrische Auswertungen der Chromatogramme. Die ausgeschnittenen Chromatogrammrollen mit dem gleichen Durchmesser (3 cm) mit den Flecken der durch Reduktion entstandenen Diformazane, wie auch die in deren unmittelbarer Nähe zur Bestimmung des Filmwertes gleich großen Chromatogrammrolle, wurden in Reagenzgläsern unter fünfminütigem Schütteln in ca 6 ml Methanol aufgenommen. Der violette Extrakt wurde weggeschüttet und die Chromatogrammrolle analog ungefähr 1 Minute mit einer neuen Methanolzugabe gewaschen. Für die eigentlich Diformazanelution wurden in das Reagenzglas je 5 ml des nachgereinigten Gemisches von N,N-Dimethylformamid (Lachema, Brno) und Essigsäure (5 : 1) abpipettiert, im kochenden Wasserbad 2 Minuten erhitzt und nach dem Durchschütteln sofort auf 20°C abgekühlt. Die Arbeiten mit den Detektionsreagentien, detegierten Chromatogrammen und Diformazaneluaten wurden bei indirekter Beleuchtung durchgeführt. Die Extinktionen von Eluaten der aus Tetrazoliumblau durch Reduktion entstandenen Diformazane wurden mit Hilfe des Zeiss-Spektrophotometers "Spekol" in 5 cm-Küvetten unter Verwendung des Aufsatzes EK 5 und ZV-Verstärkers bei 602 nm, die Extinktionen von Eluaten der aus Neotetrazoliumblau durch Reduktion entstandenen Diformazane bei 552 nm ermittelt.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Die Reduktion der Ditetrazoliumsalze verläuft unter energischeren und mäßigeren Reduktionsbedingungen unterschiedlich⁷. Im ersteren Fall bilden sich als Reduktionsendprodukte Diformazane, im zweiten Fall entstehen reversible Reduktionszwischenprodukte, die offensichtlich den Charakter freier Radikale aufweisen⁷.

Diformazane entstehen auf den Chromatogrammen aus Tetrazoliumblau oder Neotetrazoliumblau nicht nur durch die Reduktionseinwirkung der getrennten Zucker sondern auch durch Reduktionseinfluß von bei tieferer alkalischer Hydrolyse des chromatographischen Papiers anfallenden Produkten. Dies erfolgt unter dem Alkalitätseinfluß des Detektionsreagens, namentlich bei über 65°C liegenden Temperaturen. Dadurch entsteht eine Verfärbung im Hintergrund des gesamten Chromatogramms, die auch nach Auswaschen der übrigen Reduktionsfarbstoffe mit Methanol bestehen bleibt und so die Filmwerte zum Nachteil der Empfindlichkeit der photometrischen Bestimmung erhöht.

Bei unter 65°C liegenden Temperaturen wird die Papierzellulose durch das alkalische Medium nur insofern verletzt, daß das Tetrazoliumsalz auf die vorausgesetzten Produkte der Partialreduktion reduziert wird, die von uns gemeinsam mit den aus den ursprünglichen Verunreinigungen des verwendeten handelsüblichen Ditetrazoliumsalzpräparats^{8,9} durch Reduktion entstandener Monofarmazane mittels

Methanols leicht extrahiert wurden. Diformazane sind in Methanol unlöslich, bei längerem Stehenlassen oder schneller in der Siedehitze entfärben sie sich in ihm sukzessive unter Zersetzung.

Die Temperatur, bei der das Detektionsreagens am Chromatogramm durch die getrennten Zucker intensiv reduziert wird und nach Auswaschen der übrigen Reduktionsfarbprodukte ein fast farbloser Chromatogrammhintergrund gewonnen wurde, beträgt für die Detektion mit Tetrazoliumblau $64^{\circ}\text{C}/1$ Std., für die Detektion mit Neotetrazoliumblau $62^{\circ}\text{C}/1$ Std.

Für die Diformazanelution aus dem Chromatogramm hatte sich N,N-Dimethylformamid als solches nicht bewährt, da es aus dem Chromatogramm die Reste des nicht ausgewaschenen Detektionsreagens eluiert, in dessen basischem Medium es sich hydrolysiert und mit den Produkten seiner Hydrolyse oder Photolyse das Detektionsreagens reduziert; dies ist schon aus der intensiven Diformazanbildung ersichtlich, die beim bloßen Mischen des Detektionsreagens mit N,N-Dimethylformamid erfolgt. Im sauren Medium treten diese Reaktionen nicht in Erscheinung, weshalb von uns das Gemisch von N,N-Dimethylformamid und Essigsäure (5 : 1) verwendet wurde, mit dem die Diformazane nach zweiminütigem Erhitzen (ggf. in der Kälte) ohne Gefahr einer Zersetzung leichter quantitativ extrahiert wurden als durch Gemische von Pyridin-Chlorwasserstoffsäure (9 : 1) oder Tetrahydrofuran¹⁰, die bisher als Lösungsmittel verschiedener Formazane herangezogen wurden. Die Färbung dieser Lösungen war im diffusen Licht mindestens 3 Stunden stabil. Nach längerer Zeit, namentlich jedoch durch Einwirkung direkten Lichtes erfolgt offensichtlich aus gleichen Gründen wie beim 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid¹¹ sukzessive Abschwächung der Farbintensität dieser Lösungen. Bei den aus Tetrazoliumblau reduzierten Diformazanlösungen sanken bis zum nächsten Tag die ursprünglichen Extinktionswerte um ungefähr 3%, bei den dem Tageslicht ausgesetzten Lösungen sogar um 15%. Da die Stabilität der Diformazanlösungen nicht nur vom Tageslicht sondern offensichtlich auch von den Produkten der N,N-Dimethylformamidphotolyse beeinflusst wird, wurde von uns für die Herstellung des Elutionsgemisches stets nachgereinigtes N,N-Dimethylformamid herangezogen.

Wie von uns nach der unter den beschriebenen Bedingungen durchgeführten Detektion festgestellt wurde, ist Neotetrazoliumblau für die D-Glucosebestimmung ungefähr 1,8mal und für die D-Fructosebestimmung annähernd 2,5mal empfindlicher als Tetrazoliumblau und D-Fructose zeigt bei Verwendung von Tetrazoliumblau eine ungefähr 2,2mal und bei Verwendung von Neotetrazoliumblau eine bis 3,5mal größere Reduktionsfähigkeit als die gleiche Menge D-Glucose. Diese Werte können aber, namentlich durch Temperatur und Erwärmungsdauer, markant beeinflusst werden. Auf beschriebene Weise wurden von uns bei Verwendung von Tetrazoliumblau und Neotetrazoliumblau $1,4 \mu\text{g D-Glucose}/5 \text{ ml}$ und $0,7 \mu\text{g Fructose}/5 \text{ ml}$ oder die gleiche Invertmenge bei der Messung in Küvetten mit einer 5 cm-Schichtstärke bestimmt. Mit Hilfe eines 0,5% Ditetrazoliumsalz enthaltenden Reagens konnten wir auf einer

Fläche von 4 cm² noch 42 µg D-Glucose/10 ml und 21 µg D-Fructose/10 ml, gemessen in 1 cm-Küvetten, detegieren.

LITERATUR

1. Fischer F. G., Dörfel H.: *Z. Physiol. Chem.* 297, 164 (1954).
2. Trojna M., Hubáček J.: *Kvasný průmysl* 9, 147 (1963).
3. Frič F., Kubániová O.: *J. Chromatog.* 11, 127 (1963).
4. Trojna M., Hubáček J.: *diese Zeitschrift* 34, 2469 (1969).
5. Cheronis N. D.: *Mikrochim. Acta* 1956, 925.
6. Cheronis N. D., Stein H.: *J. Chem. Educ.* 33, 120 (1956).
7. Tyrer J. H., Eadie M. J., Hooper W. D.: *J. Chromatog.* 39, 312 (1969).
8. Jones G. R. N.: *Histochemical J.* 1, 59 (1968).
9. Jones G. R. N.: *J. Chromatog.* 39, 336 (1969).
10. Pádr Z.: *Tetrazoliové soli*, S. 109. Herausgegeben von Státní zdravotnické nakladatelství, Prag 1959.
11. Kuhn R., Weitz H. M.: *Chem. Ber.* 86, 1199 (1953).

Übersetzt von K. Grundfest.