

### 13. Quantitative Bestimmung, Charakterisierung und Stabilität von Magnesium 5-Methyltetrahydrofolat

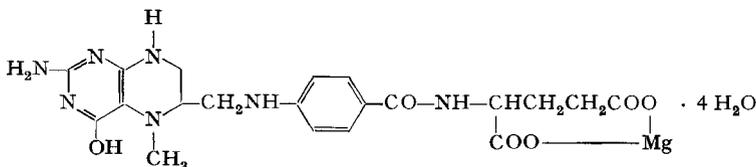
von Josef Conti, Hans Suter und Rita Widler

Forschungsinstitut EPROVA Aktiengesellschaft Schaffhausen

(10. X. 73)

**Zusammenfassung.** Die Eigenschaften des Magnesiumsalzes der 5-Methyltetrahydrofolsäure und eine spezifische Methode zu seiner quantitativen Bestimmung werden beschrieben. Die Stabilitäten der Na-, Mg-, Ca-, Ba-Salze werden vergleichend untersucht.

**1. Einleitung.** – Bei unseren Untersuchungen verschiedener Salze der 5-Methyltetrahydrofolsäure (5-MeTHFS) in kristalliner, kristallwasserhaltiger Form zeigte sich, dass das Magnesiumsalz bei Raumtemperatur besonders stabil ist (vgl. unter Ref. [1] die Unstabilität des Bariumsalzes). Das Magnesiumsalz lässt sich chromatographisch rein herstellen und stellt ein physiologisch verträgliches Salz dar.



Magnesiumsalz der *dl/l*-5-Methyl-tetrahydrofolsäure (Mg-5-MeTHF).

**2. Eigenschaften.** –  $C_{20}H_{23}MgN_7O_6 \cdot 4H_2O$  (553,82), Ber. C 43,4, N 17,7, Mg 4,4,  $H_2O$  13,0%; Gef. C 43,3, N 17,4, Mg 4,3,  $H_2O$  12,8%. Aspekt: Farbloses, mikrokristallines Pulver. Löslichkeit: 1,1 g in 100 ml Wasser bei 24°. Unlöslich in organischen Lösungsmitteln. Schmilzt nicht bis 300°. UV.-Spektrum: Eine 0,001245proz. (g/v)

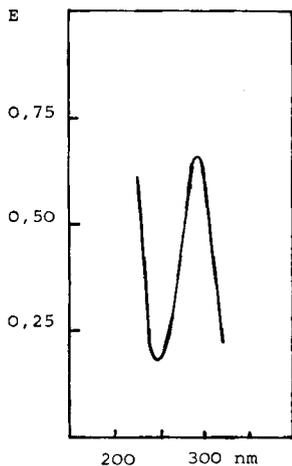


Fig. 1. UV.-Spektrum von *dl/l*-Mg-THF-at-4  $H_2O$   $c = 12,45 \text{ mg/l} (= 2,248 \cdot 10^{-5} \text{ M})$  Phosphatpuffer pH 7,0;  $d = 1 \text{ cm}$   $E_{290} = 0,665$  (Max.,  $\epsilon = 29,6 \cdot 10^3$ ),  $E_{245} = 0,181$  (Min.,  $\epsilon = 8,05 \cdot 10^3$ ),  $\epsilon_{\text{max.}}/\epsilon_{\text{min.}} = 3,7$

Lösung in sauerstofffreiem Phosphatpuffer pH 7,0 weist ein charakteristisches Spektrum auf: Max. bei 290 nm. Min. bei 245 nm (siehe Fig. 1).

(Phosphatpuffer pH 7,0 = 36,08 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  + 17,6 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  pro 1 l Std. mit Stickstoff sauerstofffrei geblasen).

In der Literatur sind folgende Werte angegeben:

*Bariumsalz*  $\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ :  $\epsilon_{290} = 30,8 \cdot 10^3$  (bei pH 7,0) [1]; *Bariumsalz*  $\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ :  $\epsilon_{290} = 30,8 \cdot 10^3$   
*Calciumsalz*  $3\text{H}_2\text{O}$ :  $\epsilon_{290} = 32,0 \cdot 10^3$ ; beide in 0,1M Phosphatpuffer pH 7,0 [2]. *Freie Säure*:  
 $\epsilon_{290} = 31,7 \cdot 10^3$  (pH 7,0) [1];  $\epsilon_{290} = 32,0 \cdot 10^3$  (pH 7,0); Verhältnis  $\frac{\epsilon_{\text{max}}}{\epsilon_{\text{min}}} = 3,85$  [3];  $\epsilon_{290} = \text{ca.}$   
 $29 \cdot 10^3$  [4].

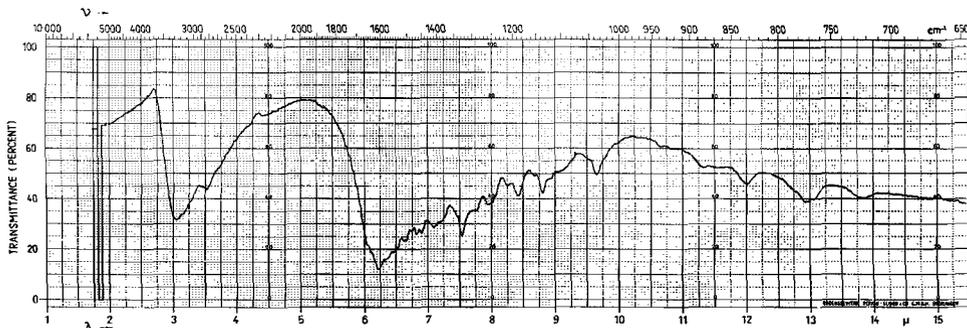


Fig. 2. IR-Spektrum von dl/L-Mg-THF-at  $\cdot 4\text{H}_2\text{O}$

IR.-Spektrum (KBr) (siehe Fig. 2). – Optische Drehung [5]:  $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +17,8^\circ$  auf wasserfreies Mg-Salz bezogen ( $c = 0,736\%$  in Wasser). – Dünnschichtchromatogramm: DC.-Alufolie Cellulose  $\text{F}_{254}$ , 0,1 mm (*Merck*); Fließmittel: 2 proz. Ca-acetat, 1,5% (v/v) 2-Mercapto-äthanol enthaltend; Auftragsmenge: 5 mm<sup>3</sup>, entsprechend 50  $\mu\text{g}$  Substanz; Laufstrecke: 15 cm;  $R_f = 0,77$ . Keine Nebenflecken. In Phosphatpuffer pH 7,0 (*Merck*), 1,5% (v/v) 2-Mercaptoäthanol enthaltend, weist das Mg-Salz der 5-MeTHFS einen einzigen Chromatographiefleck mit  $R_f$  0,86 auf.

In der Literatur [2] ist ein  $R_f$ -Wert von 0,84 mit einem schwachen, blau fluoreszierenden Nebenleck mit  $R_f$  0,52 angegeben.

DC.: Cellulose MN 300 F 254 (0,25 mm), entwickelt in 0,1M Phosphatpuffer pH 7,0, 0,5% (v/v) 2-Mercaptoäthanol enthaltend.

### 3. Methode zur quantitativen Bestimmung von 5-Methyltetrahydrofolaten. –

Die Methodik beruht auf demselben Prinzip wie das früher von uns publizierte Verfahren [6] zur Reinheitsprüfung von 5-Formyltetrahydrofolsaurem Calcium, nämlich a) Chromatographische Auftrennung; b) Extraktion des reinen Chromatographieflecks; c) Photospektrometrische Ausmessung des Extraktes. Bei 5-Methyltetrahydrofolaten muss jedoch, wegen der Empfindlichkeit gegen oxydative Einflüsse, dem Oxydationsschutz beim Chromatographieren besondere Aufmerksamkeit geschenkt werden.

a) *Chromatographische Auftrennung*. Tank: Normaler DC.-Chromatographietank. Platten: «*Merck*» DC.-Alufolien (20  $\times$  20 cm) Cellulose  $\text{F}_{254}$ -7 senkrechte Bahnen von 2 cm Breite. Lauf-

strecke: 15 cm; Laufzeit: ca. 2 Std.; Fliessmittel: 2proz. Calciumacetat in Wasser; Zusatz von 1,5 ml 2-Mercaptoäthanol pro 100 ml Fliessmittel. Standard-Lösung: 100,0 mg 5-Methyl-tetrahydrofolsaures Magnesium-4H<sub>2</sub>O/10 ml (ausgekochtes Wasser mit Zusatz von 1,5% (v/v) 2-Mercaptoäthanol). Analysenlösung: 100,0 mg Analysensubstanz/10 ml. Die Lösungen dürfen nicht geschüttelt, sondern nur durch Kippen der Messkölbchen hergestellt werden. Frisch hergestellte Lösungen einsetzen. Auftragsmenge: 5 µl pro Fleck, entsprechend 50 µg Substanz. Unter Stickstoff mit Hilfe einer «Microcap» Mikrokapillare auftragen. Startpunkte: 1, 2, 3 für Standardlösung (chromatographisch rein); 4 für Blindwert (ohne Substanz) frei lassen; 5, 6, 7 für Analysenlösung. Markierung der Chromatographieflecken: Die DC-Platte wird nach der Entwicklung 1–2 Std. im Stickstoff-Strom (DC.-Tank mit PVC-Deckel) getrocknet. Unter der UV.-Lampe (254 nm) werden die Chromatographieflecken (Hauptflecken) mit Bleistift markiert und als quadratische bzw. rechteckige Plättchen ausgeschnitten.

b) *Extraktion der Chromatographieflecken.* Extraktionsmittel: 36,08 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O und 17,6 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in 960 ml ausgekochtem, demineralisiertem Wasser auflösen; 3,0 g Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> p.a. und 31,6 ml 1,00N NaOH zugeben; 1 Std. N<sub>2</sub> durch die Lösung blasen. Extraktionsbehälter: Zentrifugengläser 10 cm lang, Ø 1,5 cm, mit Plastikstopfen. Extraktion: Die 7 DC.-Plättchen werden sorgfältig leicht gefaltet und jedes einzeln in ein Zentrifugenglas gesteckt. Je 5,00 ml Extraktionsmittel werden zupipettiert und die verschlossenen Röhrchen auf einem Schütteltisch in horizontaler Lage 30 Min. geschüttelt bis die Aluminiumplättchen frei von Adsorbens sind. Anschliessend werden die Röhrchen 5 Min. zentrifugiert (5000 T/Min.).

c) *Photospektrometrische Messung:* Die klaren Extraktionslösungen werden beim Absorptionsmaximum (290 nm) gegen die Blindprobe (No. 4) gemessen. 1 cm Quarz-Küvetten.

$$\text{Gehalt: } \frac{\bar{E}_A \cdot 100}{\bar{E}_S} = \dots \% \text{ C}_{20}\text{H}_{23}\text{MgN}_7\text{O}_6 \cdot \text{Mg} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$$

$\bar{E}_A$  = Mittelwert der 3 Extinktionen (Analysenlösung, Punkte 5–7)

$\bar{E}_S$  = Mittelwert der 3 Extinktionen (Standardlösung, Punkte 1–3)

**4. Diskussion der Ergebnisse.** – a) *Extraktionsverlust:* Eine Lösung von chromatographisch reinem Mg-5-MeTHF wurde direkt spektrophotometrisch gemessen, bzw. auf eine Celluloseschicht (DC.-Fertigplatte, Glas) aufpipettiert, abgekratzt, extrahiert und photospektrometrisch gegen eine Blindextraktion gemessen. Bei einer Serie von 7 Extraktionen konnten wir im Mittel 99,2% der aufgesetzten Substanz extrahieren. Standard-Abweichung = 1,9%.

*Extraktionsverlust im Mittel: 0,8%.*

b) *Chromatographie- und Extraktionsverlust.* Mit chromatographisch reinem Mg-5-MeTHF wurde eine Serie von 11 Analysen (DC.-Chromatographie, Extraktion des Chromatographiefleckens und spektrophotometrische Messung) durchgeführt und die Messwerte auf die Extinktion bezogen, wie sie bei der direkten spektrophotometrischen Messung der Stammlösung bestimmt wurde. Der Inhalt des benützten 5 µl Microcaps wurde auf einer Mikrowaage ausgewogen und berücksichtigt (4,885 µl). Wir fanden in den Extrakten im Mittel 97,9% der eingesetzten Substanz wieder. Standard-Abweichung = 1,1%.

*Chromatographie- und Extraktionsverlust = 2,1% (Mittelwert).*

c) *Reproduzierbarkeit.* Bei einer Serie von 18 Einzelbestimmungen wurde die oben beschriebene Analysenmethode geprüft. Für sämtliche Bestimmungen wurde ein und dasselbe reine Mg-5-MeTHF verwendet. Auf 6 DC.-Platten wurden auf die Punkte 1–3 je 50 µg und auf die Punkte 5–7 je 30 µg Mg-5-MeTHF aufgetragen (Punkt 4 =

Blindwert). Es wurde wie üblich chromatographiert, extrahiert und spektrophotometrisch gemessen. Die einzelnen E-Werte der 30  $\mu\text{g}$ -Extraktionen wurden bezogen auf das Mittel der E-Werte der 50  $\mu\text{g}$  Extraktionen der jeweils gleichen DC.-Platte. Wir fanden im Durchschnitt von den aufgetragenen 30  $\mu\text{g}$  29,8  $\mu\text{g}$  Mg-5-MeTHF wieder. *Standard-Abweichung* 0,7  $\mu\text{g}$ .

**5. Stabilität von chromatographisch reinen Salzen der 5-MeTHFS.** – Die chromatographisch reinen Na-, Ca-, Ba-Salze wurden über die freie 5-Me-THFS, das Bleisalz bzw. das Magnesiumsalz hergestellt. Die bei Raumtemperatur gelagerten kristallwasserhaltigen Salze der 5-MeTHFS wurden nach der beschriebenen Methode analysiert. Als Bezugssubstanzen dienten dieselben Salze aus gleicher Charge, jedoch bei  $-20^\circ$  unter Stickstoff im Dunkeln gelagert. Die in der Tabelle aufgeführten mittleren Gehaltsangaben basieren auf 3fachen Bestimmungen. In der letzten Kolonne ist die mittlere Abweichung vom Mittelwert angegeben.

Salz der 5-MeTHF	Lagerungsbedingungen				Mittlerer Gehalt	Mittl. Abw.
	Dauer	Temp.	Schutzgas	Lichtschutz		
Mg · 4H <sub>2</sub> O	4 Monate	Raumtemp.	N <sub>2</sub>	ja	100,5%	0,7%
Mg · 4H <sub>2</sub> O	10 Monate	Raumtemp.	N <sub>2</sub>	ja	99,5%	1,3%
Mg · 4H <sub>2</sub> O	6 Monate	Raumtemp.	N <sub>2</sub>	nein	98,3%	0,6%
Mg · 4H <sub>2</sub> O	1 Jahr	Raumtemp.	N <sub>2</sub>	nein	98,6%	0,7%
Aspekt: Unverändert, keine Verfärbung						
Ca. 4H <sub>2</sub> O	6 Monate	Raumtemp.	N <sub>2</sub>	nein	96,2%	0,7%
Ca. 4H <sub>2</sub> O	6 Monate	Raumtemp.	N <sub>2</sub>	nein	97,4%	2,3%
Aspekt: Verändert, gelbliche Verfärbung						
Na. 3H <sub>2</sub> O	6 Monate	Raumtemp.	N <sub>2</sub>	nein	97,6%	3,1%
Aspekt: Verändert, stark gelbe Verfärbung						
Ba. 4H <sub>2</sub> O	3 Monate	Raumtemp.	N <sub>2</sub>	ja	97,5%	0,8%
Aspekt: Verändert, stark beige Verfärbung						

## LITERATURVERZEICHNIS

- [1] V. S. Gupta & F. M. Huennekens, Arch. Biochemistry Biophys. 120, 712–718 (1967).  
 [2] J. A. Blair & K. J. Saunders, Analyt. Biochemistry 34, 376–381 (1970).  
 [3] J. A. Blair & K. J. Saunders, Analyt. Biochemistry 41, 332–337 (1971).  
 [4] A. R. Larrabee, S. Rosenthal, R. E. Cathou & J. M. Buchanan, J. Amer. chem. Soc. 83, 4094–4095 (1961); J. biol. Chemistry 238, 1025–1031 (1963).  
 [5] J. C. Keresztesy & K. O. Donaldson, Iowa St. J. Sci. 38, 41–44 (1963).  
 [6] H. Suter, J. Conti, M. Litmanowitsch, A. Grossmann & A. Hedinger, Helv. 56, 866–875 (1973).