

Quantitative Bestimmung von Saccharose mit Triphenyltetrazoliumchlorid mittels Papierchromatographie

Es ist eine ganze Reihe von Verfahren zur quantitativen Bestimmung der Saccharose mittels Papierchromatographie bekannt. Die Quantität wird entweder *in situ*, also nach Detektion direkt am chromatographischen Papier gewöhnlich mit dem Densitometer bestimmt, oder erst nach Elution der Saccharose aus dem chromatographischen Papier ausgewertet. Die eluierte Saccharose wird dann entweder titrimetrisch oder kolorimetrisch bestimmt.

Die quantitative Auswertung *in situ* ist zwar schnell, aber weniger genau und, was die Ausstattung an Geräten anbelangt ziemlich anspruchsvoll. Von den titrimetrischen Methoden wird am häufigsten die Perjodatmethode¹, von den kolorimetrischen die Methode nach SOMOGYI-NELSON² angewendet nach saurer Hydrolyse der Saccharose.

Beide Methoden zeichnen sich durch hohe Genauigkeit aus, sind aber an Zeit und Arbeit sehr anspruchsvoll. Diese Nachteile der angeführten Methoden gaben uns den Anlass, die sehr elegante und schnelle Methode von FISCHER UND DÖRFEL³ nach der die reduzierenden Zucker mit Hilfe von Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) bestimmt werden, auch auf die quantitative Bestimmung der Saccharose anzuwenden.

Methodisches

Der einzige gangbare Weg zur Bestimmung der Saccharose mittels TTC war ihre Hydrolyse mit dem Enzym Invertase, genauer β -h-Fruktosidase*. Zur Hydrolyse der Saccharose verwendeten wir das genannte Präparat, das nach vorhergehender Aufbereitung keinerlei reduzierende Eigenschaften auf TTC aufwies und den reinen Präparaten von Spitzenfirmen (Merck) gleichkam.

Die Aktivität des Enzyms war 6.55 Min./g des Präparats (die Zeit, die zur Hydrolyse von 4 g Saccharose in 25 cm³ Lösung bei einer Temperatur von 15.5° nötig ist, bis zur Herabsetzung des optischen Drehungsvermögens auf Null).

Die Enzymlösung wurde aus 0.1 g enzymatischen Präparats in 50 cm³ 0.5 % KH₂PO₄-Lösung hergestellt. Nach gründlicher Durchmischung wurde die Lösung bei 2,000 g zentrifugiert. Zur Besprühung wurde das klare Supernatant verwendet. Das chromatographische Papier wurde in seiner Gänze gleichmässig mit der Enzymlösung besprüht und in der feuchten Kammer bei 18–20° für 40 Min. inkubiert. Die Verlängerung der Inkubierung bis auf 60 Min. hat keinen Einfluss auf die quantitative Auswertung (siehe Fig. 1). Nach Beendigung der Inkubation wird das Chromatogramm bei 60–70° ausgetrocknet. Das weitere Verfahren wird nach den Vorschriften von FISCHER UND DÖRFEL ausgeführt.

Das chromatographische Papier wird durch eine frische Lösung von TTC (1 Teil 1 N NaOH in Methanol und 1 Teil 4 % TTC in Methanol) gezogen und frei getrocknet. Es empfiehlt sich die angeführten Operationen bei rotem Licht, oder wenigstens in Dämmerlicht auszuführen, damit der Hintergrund des Papiers lichtrosa verbleibt. Das chromatographische Papier wird dann 30 Min. bei 70° getrocknet. Die roten

* Das enzymatische Präparat bekamen wir aus dem Nährmittelforschungsinstitut in Bratislava (Výskumný ústav potravinársky), wo sie es durch Dehydrierung biologisch aktiver Hefe mittels Alkylglykoläther nach einer von ihnen patentierten Methode präparierten⁴.

Flecke der "Saccharose" werden ausgeschnitten und in 10 cm³ Mischung von Methanol und Essigsäure (10:1) eluiert. Die Elution wird in 10 Min. bei Zimmertemperatur ausgeführt.

Die Auswertung erfolgte auf einem Lange-Kolorimeter IV (blaues Filter) auf Grund einer Kalibrationskurve, die für jeden Papierbogen resp. für jede Versuchsserie eigens angefertigt wird.

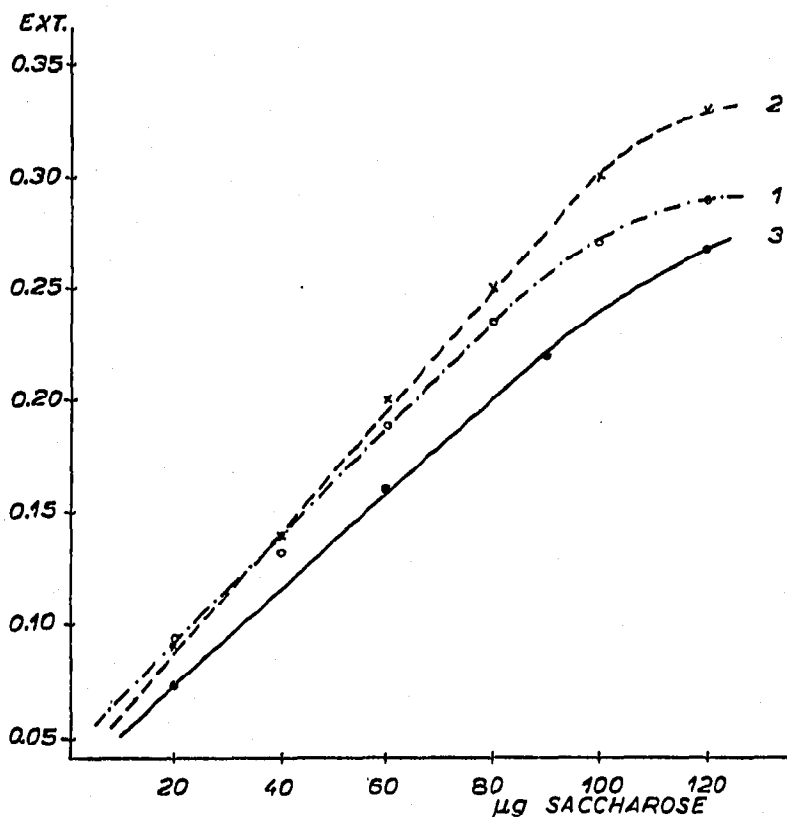


Fig. 1. Kalibrationskurve der Saccharose nach 20 (Kurve 1), 40 (Kurve 2), und 60 Min. (Kurve 3) enzymatischer Hydrolyse.

Diskussion

Die angeführte Methode zur Bestimmung der Saccharose hat sich bei unseren Serienanalysen von Pflanzenmaterial sehr bewährt. Um die Genauigkeit und Verlässlichkeit der Methode zu prüfen, haben wir eine ganze Reihe von Bestimmungen durchgeführt. Mit Rücksicht darauf, dass wir ein technisches enzymatisches Präparat verwendeten, haben wir seinen Einfluss auf die quantitative Bestimmung von Trauben- und Fruchtzucker durchgeführt. Die Ergebnisse haben gezeigt, dass es nach 60 Min. Inkubationszeit nur zu sehr geringen Verschiebungen der Kalibrationskurven der mit dem Enzym besprühten und nicht besprühten Flecke des Frucht- und Traubenzuckers kommt (Fig. 3 und 4). Auf die Genauigkeit der quantitativen Auswertung hat die Besprühung mit dem Enzympräparat überhaupt keinen Einfluss, da seine Veränderungen in der Kalibrierungskurve eingeschlossen sind. Um die optimale Zeitdauer der enzymatischen Hydrolyse festzustellen, haben wir ganze Serien von Proben nach 20, 40 und 60 Min. Hydrolyse ausgewertet. Die Ergebnisse zeigen, dass eine enzymatische Hydrolyse von 40 Min. Dauer am vorteilhaftesten ist (siehe Fig. 1).

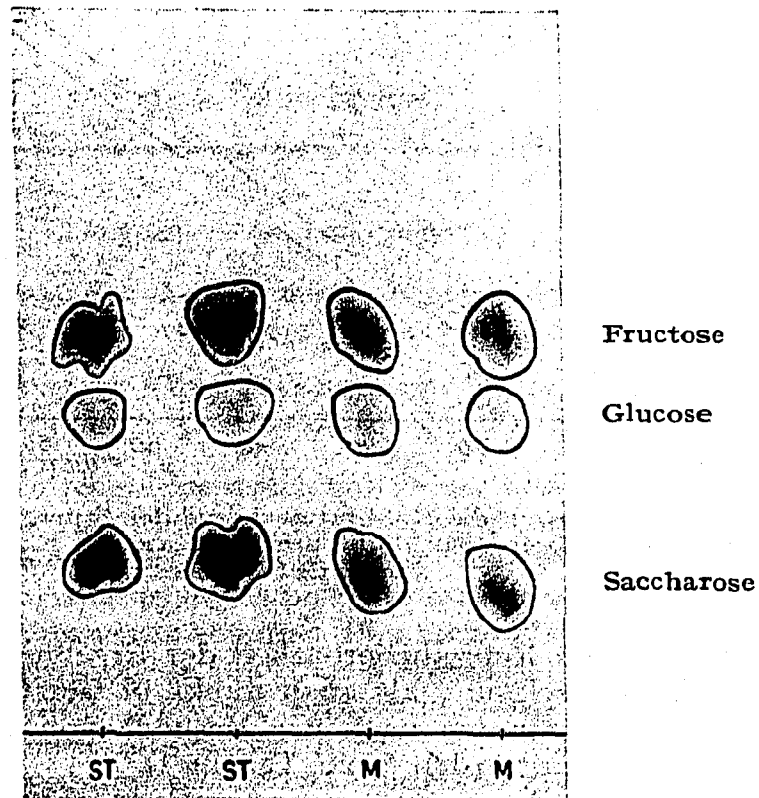


Fig. 2. Chromatogramm der Zucker nach enzymatischer Hydrolyse detegiert mit TTC. Entwicklungssystem Butanol-Essigsäure-Wasser (4:1:5); entwickelt 48 Stunden mit Durchlauf auf Whatman No. 1 Papier.

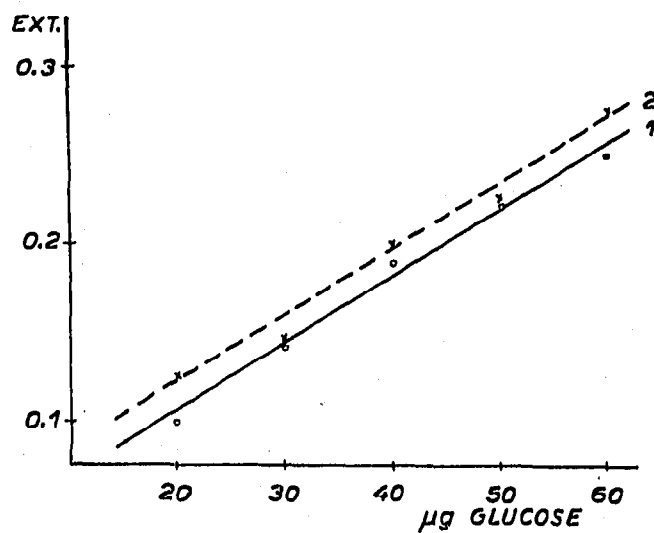


Fig. 3. Einfluss der Invertase auf die Kalibrationskurve der Glukose nach 60 Min. Inkubationszeit. (1) Kalibrationskurve nach Besprühung mit Invertase. (2) Kalibrationskurve ohne Besprühung mit Invertase.

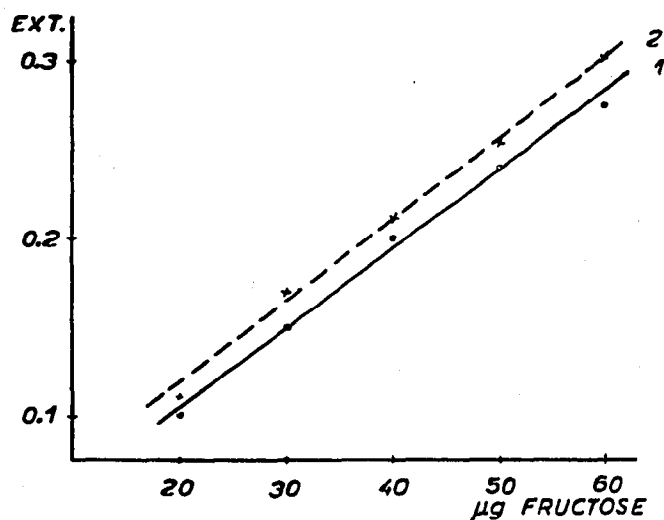


Fig. 4. Einfluss der Invertase auf die Kalibrationskurve der Fructose nach 60 Min. Inkubationszeit. (1) Kalibrationskurve nach Besprühung mit Invertase. (2) Kalibrationskurve ohne Besprühung mit Invertase.

Die Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse haben wir sowohl mit einer Standard-Saccharoselösung als auch direkt in Gerstenblättern überprüft, wo die angeführten Werte mit den nach der Methode von SOMOGYI-NELSON festgestellten Werten verglichen wurden (siehe Tabelle I).

TABELLE I

	<i>n</i>	Ermittlung der Saccharose nach Somogyi-Nelson mg/l g Trockensubstanz	Ermittlung von Saccharose mittels TTC mg/l g Trockensubstanz
30 µg	6	—	31 µg ± 2.1
80 µg	4	—	78.5 µg ± 3.3
I Blatt	4	33.6 ± 1.08	34.0 ± 0.99
II Blatt	4	29.4 ± 0.91	27.1 ± 0.92
III Blatt	4	15.6 ± 1.01	13.8 ± 0.87

*Tschechoslowakische Akademie der Wissenschaften,
Biologisches Institut der Slowakischen Akademie der Wissenschaften,
Abteilung für Pflanzenphysiologie,
Bratislava (Tschechoslowakei)*

F. FRIČ
O. KUBÁNIOVÁ

¹ E. L. HIRST UND J. K. N. JONES, *J. Chem. Soc.*, (1949) 1659.

² B. KEIL UND Z. ŠORMOVÁ, *Laboratorní technika biochemie*, Nakl. ČSAV, Prag, 1959, S. 494.

³ F. G. FISCHER UND H. DÖRFEL, *Z. Physiol. Chem.*, 297 (1954) 164.

⁴ ST. BARICA, J. KOSTOLANSKÁ, M. TIBENSKÁ, E. LIŠKOVÁ UND E. BEČOVÁ, *Štúdium výroby koncentrátnu β-h-fruktozidázy pre použitie v cukrovinkárskom priemysle a pri výrobe perníkov*, Schlussarbeit 1959, Nährmittelforschungsinstitut in Bratislava.

Eingegangen den 12. Oktober 1962