

CHROM. 3514

## Elektrophorese und Dünnschicht-Gelfiltration von Nitro-Blautetrazoliumchlorid

Nitro-Blautetrazoliumchlorid\* bietet bei seiner Verwendung in der Histochemie gewisse Vorteile gegenüber anderen Tetrazoliumsalzen<sup>1</sup>. Als nachteilig, vor allem für quantitative Auswertungen, erweist sich jedoch, dass der nach Reduktion gebildete Formazanniederschlag nicht einheitlich blau gefärbt ist, sondern rote Anteile enthält. Zur näheren Charakterisierung der einzelnen Komponenten wurden mehrere NBT-Präparate verschiedener Herkunft mittels Papierelektrophorese und Dünnschicht-Gelfiltration untersucht.

### Experimentelles

*Substanzen.* Folgende NBT-Präparate wurden überprüft:

- (1) Ein Handelsprodukt amerikanischer Herkunft, Firma unbekannt.
- (2) Nitro-BT, p.a.; Ferak, Berlin.
- (3) Nitrotetrazolium Blau rein, Lachema, Chemapol, Prag.
- (4) NBT synthetisiert nach TSOV u.a.<sup>2</sup> und RIED UND GICK<sup>3</sup>.

Die Reduktion der Präparate nach der Elektrophorese und Gelfiltration zum Zweck der Sichtbarmachung erfolgte mit alkalischer Ascorbinsäurelösung.

*Elektrophorese.* Es fand das Gerät E Ph 60 zur kontinuierlichen Papierelektrophorese der Firma Ströhlein & Co., Ilmenau, Verwendung. Für analytische Untersuchungen wurden pro Std. 0.4 ml einer 0.1%igen Lösung des jeweiligen NBT-Präparates in Ameisensäure-Essigsäure-Wasser-Puffer (5:15:80, v/v/v), pH ~ 1.2 aufgebracht. Mit diesem Puffer wurde auch die Elektrophorese durchgeführt. Als Trägermaterial diente Papier der Sorte FN 8 des VEB Spezialpapierfabrik Niederschlag. Nach Äquilibrierung über Nacht wurde eine Spannung von 400 V angelegt; die Laufzeit betrug 7-8 Std.

*Dünnschicht-Gelfiltration.* Diese wurde auf Glasplatten mit den Abmessungen 20 × 40 cm ausgeführt, die 0.25 mm stark mit Sephadex G-25 Superfine (Pharmacia, Uppsala) beschichtet waren. Als Fließmittel diente 0.9%ige Natriumchloridlösung. Die Platte wurde über Nacht äquilibriert. Die Strömungsgeschwindigkeit war so eingestellt, dass Blue Dextran 2000 (Pharmacia, Uppsala) sich mit einer Geschwindigkeit von 1 bis 2 cm/Std. bewegte. Eine Trennung erforderte unter diesen Bedingungen 40-50 Std. Es wurden etwa 40 µg des jeweiligen Präparates, gelöst in Ameisensäure-Essigsäure-Wasser-Puffer, aufgebracht.

### Ergebnisse

Mittels kontinuierlicher Papierelektrophorese lassen sich die untersuchten NBT-Präparate Nr. 2 (Fig. 1b) und Nr. 4 (Fig. 1d) in jeweils zwei Komponenten auftrennen. Die am weitesten kathodisch wandernde starke Bande färbt sich nach Reduktion mit alkalischer Ascorbinsäure blauviolett an und entspricht dem Diformazan des NBT. Daneben wird eine schwache, langsamer wandernde, im reduzierten

\* = NBT = 3,3'-(3,3'-Dimethoxy-4,4'-diphenyl)-bis-[2-(p-nitrophenyl)-5-phenyl-tetrazoliumchlorid].

Zustand rote Bande beobachtet. Präparat Nr. 1 (Fig. 1a) enthält darüberhinaus eine weitere, nach Reduktion rot erscheinende Komponente, die jedoch weiter kathodisch wandert, als das dem NBT entsprechende blauviolette Diformazan. Präparat Nr. 3 (Fig. 1c) erwies sich als einheitlich und ergab reduziert nur die blauviolette Bande des Diformazans.

Die Dünnschicht-Gelfiltration erbrachte prinzipiell gleiche Befunde (Fig. 2). Die Präparate Nr. 1, 2 und 4 enthielten Anteile, die nach Reduktion als schwache rote Flecken hinter der kräftig blauviolett gefärbten Hauptkomponente sichtbar wurden, Präparat Nr. 3 erwies sich auch mit diesem Verfahren als einheitlich.

Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die nach Einwirkung alkalischer Ascorbinsäure rot gefärbte Verbindung einerseits eine niedrigere elektrische Ladung, zum anderen eine geringere Molekülgrösse als die blauviolette Komponente haben muss. Da bereits mehrere Autoren darauf hingewiesen haben, dass bei der Synthese von Ditetrazoliumsalsen Nebenprodukte mit kleinerem Molekulargewicht, so vor

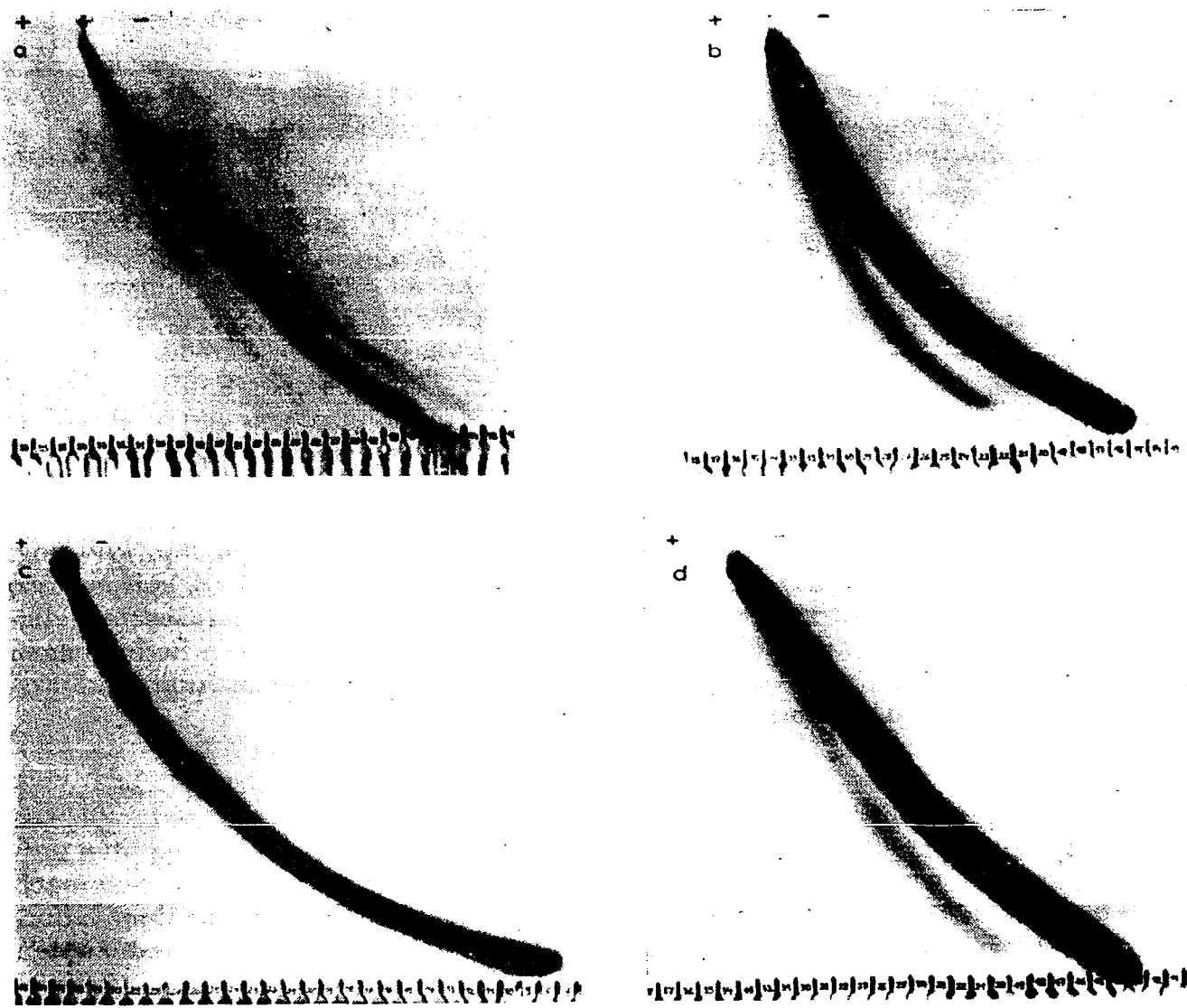


Fig. 1. Kontinuierliche Papierelektrophorese von NBT. (a) Präparat Nr. 1, (b) Präparat Nr. 2, (c) Präparat Nr. 3, (d) Präparat Nr. 4, Versuchsdaten siehe Text.

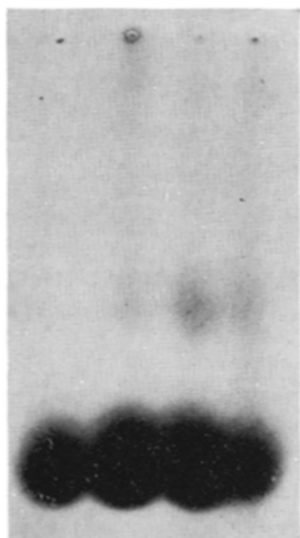


Fig. 2. Dünnschicht-Gelfiltration von NBT. Von rechts nach links: Präparate Nr. 1, 2, 4, 3. Versuchsdaten siehe Text.

allem auch die entsprechenden Monotetrazoliumsalze, entstehen können<sup>2,4,5</sup>, lag der Gedanke nahe, die nach Reduktion rot erscheinende Verbindung mit dem ebenfalls rot gefärbten Monoformazan des NBT zu vergleichen. Dabei zeigten beide Substanzen nicht nur ein gleiches Löslichkeitsverhalten gegenüber verschiedenen organischen Lösungsmitteln, sondern auch identische Absorptionsspektren. Die Präparate Nr. 1, 2 und 4 enthielten also im Gegensatz zum Präparat Nr. 3 noch das Monotetrazoliumsalz des NBT. Nicht geklärt werden konnte der Charakter der in Präparat Nr. 1 (Fig. 1a) am weitesten kathodisch wandernden Verbindung, die nach Reduktion ebenfalls rot gefärbt war.

*Pathologisches Institut der Medizinischen Akademie  
"Carl Gustav Carus" Dresden, Schubertstr. 15,  
8053 Dresden (D.D.R.)*

H. GROSSMANN  
H. WAGNER

1 W. MEIER-RUGE, *Med. Lab.*, 18 (1965) 233.

2 K.-CH. TSOU, CH.-SH. CHENG, M. M. NACHLAS UND A. M. SELIGMAN, *J. Am. Chem. Soc.*, 78 (1956) 6139.

3 W. RIED UND H. GICK, *Ann. Chem.*, 581 (1953) 16.

4 C. G. ROSA UND K.-C. TSOU, *J. Cell Biol.*, 16 (1963) 445.

5 W. MEIER-RUGE, *Histochemie*, 4 (1965) 438.

Eingegangen den 19. März 1968