

## Zur Kenntnis des alkalischen Zuckerabbaues.

IV. Mitteilung:

Versuch einer papierchromatographischen Trennung und  
quantitativen polarographischen Bestimmung einiger  
Abbauprodukte\*.

Von

V. Prey, E. Waldmann, F. Ludwig und H. Berbalk.

Aus dem Institut für Organische Chemie der Technischen Hochschule Wien.

(Eingelangt am 15. Juli 1952. Vorgelegt in der Sitzung am 16. Okt. 1952.)

Wir haben in einer früheren Veröffentlichung über die Möglichkeit berichtet, Gemische von Substanzen des alkalischen Zuckerabbaues auf polarographischem Wege qualitativ und quantitativ zu trennen und zu erfassen.

Gleichzeitig haben wir darauf hingewiesen, daß wir eine Kombination von papierchromatographischen und polarographischen Methoden noch für wesentlich trennschärfer hielten.

In der Papierchromatographie der Zucker wurden schon von mehreren Bearbeitern sehr beachtliche Erfolge erzielt<sup>1</sup>.

Von den Zuckerbruchstücken, wie sie beim alkalischen Zuckerabbau entstehen können, wurden schon die  $R_F$ -Werte von Milchsäure, Brenztraubensäure und Dioxyaceton in Butanol-Essigsäure-Wasser-Salzsäure<sup>2</sup> sowie die  $R_F$ -Werte der Brenztraubensäure in Propionsäure-Butanol-Wasser<sup>3</sup> angegeben.

Wir versuchten zuerst, Methylglyoxal (I), Dioxyaceton (II), Brenz-

---

\* Diese Arbeit ist ein Teil eines größeren Forschungsprogrammes, für das die Gesellschaft für Holzforschung die Mittel bereitgestellt hat, wofür wir bestens danken.

<sup>1</sup> F. Cramer, *Angew. Chem.* **62**, 73 (1950). — S. M. Partridge, *Biochem. J.* **42**, 238 (1948).

<sup>2</sup> J. G. Buchanan, C. A. Decker und A. G. Long, *J. chem. Soc. London* **1950**, 3162.

<sup>3</sup> T. Wieland und E. Fischer, *Naturwiss.* **36**, 219 (1949).

traubensäure (III), Milchsäure (IV), Glycerinaldehyd (V) und Acetol (VI) unter Verwendung des von *Buchanan* angewendeten Lösungsmittels (Butanol-Essigsäure-Wasser mit und ohne Salzsäurezusatz) zu trennen. Die dabei erzielten Ergebnisse waren nicht befriedigend.

Bei den zahlreichen Versuchen nach einem Lösungsmittelgemisch, bei dem die  $R_F$ -Werte der von uns zu bestimmenden Stoffe weit genug auseinanderlagen, um eine saubere Trennung zu ermöglichen, wurde ein solches Gemisch von uns in der Zusammensetzung 30 T. Cyclohexanol, 18 T. Pyridin und 18 T. Wasser gefunden.

Die  $R_F$ -Werte betragen: I —, II 0,49, III 0,19, IV 0,40, V 0,32, VI 0,77.

Zur Entwicklung der Chromatogramme eignete sich für II, III, V, VI am besten eine 1%ige alkohol. Lösung von m-Phenylendiamindihydrochlorid<sup>4</sup>, für IV eine 1%ige benzolische Bleitetraacetatlösung<sup>2</sup>.

Auf diese Weise war es möglich, die Stoffe II bis VI einwandfrei zu trennen.

I kann chromatographisch nicht erfaßt werden. Während bei aufsteigenden Chromatogrammen je nach Zeitdauer noch Teile von Methylglyoxal nachgewiesen werden können, sind bei der absteigenden Arbeitsweise bei einer Laufzeit über 10 Stdn. nicht einmal mehr Spuren nachweisbar.

Da I ja ohneweiters als Bis-m-nitrobenzhydrazon<sup>5</sup> qualitativ und quantitativ bestimmt werden kann, wurde das merkwürdige Verhalten des I beim Chromatographieren in einer parallellaufenden Arbeit weiter verfolgt, und es wird darüber zu einem späteren Zeitpunkt berichtet.

Die quantitative Erfassung der durch Papierchromatographie getrennten Stoffe erfolgte einerseits nach der Fleckengröße (Flächeninhalt)<sup>6</sup>, andererseits durch Eluierung<sup>7</sup> der Einzelstoffe und polarographische Bestimmung der Eluate<sup>8</sup>.

Während die Polarogramme von II, III und VI gut auswertbar waren, war der Glycerinaldehyd (V) einzelpolarographisch wegen seiner kleinen, schlecht ausgeprägten Stufen bei den in Frage kommenden geringen Konzentrationen nur schlecht vermeßbar.

Wir führten deshalb V durch Destillation mit 20%iger Schwefelsäure<sup>9</sup> in Methylglyoxal über; dieses kann nun seinerseits einwandfrei

<sup>4</sup> *E. Chargaff, C. Levine und Ch. Green, J. biol. Chem.* **175**, 67 (1948).

<sup>5</sup> *V. Prey, E. Waldmann und F. Ludwig, Mh. Chem.* **82**, 1022 (1951).

<sup>6</sup> *G. C. Gibbons und R. A. Boissonas, Helv. chim. Acta* **33**, 1477 (1950). — *R. B. Fischer, B. S. Parson und G. A. Morrison, Nature (London)* **161**, 764 (1948); **164**, 183 (1949).

<sup>7</sup> *C. E. Dent, W. Stepka und F. C. Steward, Nature (London)* **160**, 682, (1947). — *C. E. Dent, Biochem. J.* **41**, 240 (1947).

<sup>8</sup> *W. Stoll, E. Waldmann, V. Prey und H. Berbalk, Mh. Chem.* **83**, 988 (1952).

<sup>9</sup> *C. Neuberg, Biochem. Z.* **83**, 262 (1917).

polarographiert werden. Noch besser ist es, wie von uns schon vorgeschlagen wurde<sup>8</sup>, das gebildete I mit o-Phenylendiamin in Methylchinoxalin überzuführen und die Chinoxalinstufe zu vermessen. Auf diese Weise ist es gelungen, auch V quantitativ zu bestimmen.

Für die polarographische Bestimmung der Brenztraubensäure und des Methylchinoxalins wurden von uns erstmalig die entsprechenden Eichkurven aufgestellt. Dabei wurde gefunden, daß es zweckmäßig ist, die Brenztraubensäure in alkalischer Lösung (Tetramethylammoniumbromidlösung als Grundlösung) zu vermessen, da dabei nur eine einzige streng mengenproportionale Stufe auftritt im Gegensatz zu den in der Literatur<sup>10</sup> beschriebenen 2 bis 3 Stufen.

Aus den Versuchsergebnissen geht hervor, daß es durch Kombination von Papierchromatographie und Polarographie gelingt, die wichtigsten Spaltstücke I bis VI, die beim alkalischen Zuckerabbau in variablen Gemischen auftreten, und für die bis jetzt keine brauchbaren analytischen Methoden bekannt waren, in einfacher Weise zu erfassen und mit einer Genauigkeit von  $\pm 3$  bis 5% quantitativ zu bestimmen.

### Experimenteller Teil.

#### *Versuche zur Ermittlung des günstigsten Lösungsmittelgemisches.*

Folgende Lösungsmittel wurden in verschiedenen Gemischen verwendet: Wasser, Alkohole (Äthanol, Propanol, Isopropanol, n-Butanol, tert. Butylalkohol, n-Pentanol, Cyclohexanol, Tetrahydrofurfurylalkohol), Säuren (Essigsäure, Salzsäure), Butylacetat, Äther (Dibutyläther, Anisol), Ketone (Methyläthylketon, Cyclohexanon), Dimethylanilin, Phenol, Heterocyclen (Tetrahydrofuran, Dioxan, Pyridin, Collidin, Chinolin). Die Orientierungsversuche mit verschiedenen Gemischen obiger Lösungsmittel wurden nach der Methode von *R. Williams* und *H. M. Kirby*<sup>11</sup> aufsteigend durchgeführt. Verwendet wurde Papier von Schleicher und Schüll Nr. 2043b, das in entsprechender Weise zu einem Zylinder zusammengerollt war und in einem Standglas, das auf seinem Boden das Lösungsmittel enthielt, gestellt war; die Laufzeit war 6 Std., die Steighöhe zirka 18 cm.

#### *R<sub>F</sub>-Werte, aufsteigende Methode.*

	40 T. Butanol 10 T. Eisessig 50 T. Wasser	40 T. Butanol 10 T. Eisessig 50 T. Wasser 2 T. Salzsäure	Phenol Wasser	30 T. Butanol 18 T. Pyridin 18 T. Wasser
I	0,85	0,85	0,48	0,89
II	0,44	0,43	0,83	0,60
III	0,72	0,51	0,59	0,40
IV	0,71	—	—	0,60
V	0,51	0,52	0,58	0,60
VI	0,71	0,64	0,94	0,78

<sup>10</sup> *M. v. Stackelberg*, Polarographische Arbeitsmethoden. 1950.

<sup>11</sup> *Science (New York)* **107**, 481 (1948).

Nachher wurden die Chromatogramme geöffnet und mit einer Infrarotlampe getrocknet, gewöhnlich mit m-Phenylendiamindihydrochlorid in 1%iger alkohol. Lösung besprüht, 10 Min. bei 100°C im Trockenschrank getrocknet und die Lage der Flecken der Substanzen I bis VI beobachtet. Nur von solchen Lösungsmittelgemischen, die eine Trennungsmöglichkeit wahrscheinlich erscheinen ließen, wurden die  $R_F$ -Werte ermittelt.

Von den Gemischen, die in die nähere Wahl kamen, wurden dann absteigende Chromatogramme aufgenommen (Beschreibung später).

$R_F$ -Werte, absteigende Methode.

	30 T. Cyclohexanol 27 T. Pyridin 9 T. Wasser	30 T. Cyclohexanol 9 T. Pyridin 27 T. Wasser	30 T. Cyclohexanol 18 T. Pyridin 6 T. Benzol 18 T. Wasser	30 T. Cyclohexanol 18 T. Pyridin 18 T. Wasser
I	—	—	—	—
II	0,51	0,47	0,48	0,49
III	0,26	0,18	0,22	0,19
IV	0,48	0,44	0,46	0,40
V	0,38	0,38	0,35	0,32
VI	0,72	0,64	0,67	0,77

Als Entwickler wurden die für Zucker gebräuchlichen Reagenzien untersucht.

Anilinthalat in mit Wasser gesättigtem Butanol	Keine scharfen Flecken (unscharfe Ränder)
Naphthoresorcin und Trichloressigsäure in alkohol. Lösung	Wie oben
Benzidin + Eisessig in absol. Alkohol	Wie oben
o-Phenylendiamin + Trichloressigsäure in alkohol. Lösung	Flecken nur im UV-Licht, sonst nicht erkennbar
m-Phenylendiamindihydrochlorid in 1%iger alkohol. Lösung	I brauner Fleck II brauner Fleck III hellgelber Fleck, im UV stark fluoreszierend IV weißer Fleck (schlecht zu erkennen) V brauner Fleck VI im UV stark blau fluoreszierend
Bromthymolblau	III, IV keine Flecken
Methylrot	III, IV keine Entwicklung
Bleitetrazetat in Benzol	IV scharfer weißer Fleck auf braunem Grund

*Quantitative Bestimmungen mit Hilfe der Fleckengröße.*

Nach der (Flächeninhalt-) Methode von *R. B. Fischer*<sup>4</sup>.

Verwendet wurde ein Papier von Schleicher & Schüll Nr. 2043 b und absteigend in großen Glaszylindern gearbeitet. Die Papierbänder waren 48 cm lang und 10 bis 16 cm breit. Sie waren an ihrem oberen Ende in einem Glasschiffchen, das mit einer Mischung Cyclohexanol + Pyridin + Wasser gefüllt war, eingehängt. Nach 26 bis 30 Stdn. Laufzeit war bei 20° C die Wanderungstrecke zirka 33 bis 35 cm.

Die Papierstreifen wurden mit einer Infrarotlampe getrocknet, sodann mit einer alkohol. 1%igen Lösung von m-Phenylendiamindihydrochlorid besprüht und 10 Min. bei 100° im Trockenschrank belassen. Die gebildeten Flecken wurden auf Millimeterpapier übertragen und der Flächeninhalt in mm<sup>2</sup> ausgezählt.

Durch Auftragen der Zahl der vermessenen mm<sup>2</sup> (Flächeninhalt) auf dem logarithmischen Ast und der Substanzmenge in mg auf dem linearen Ast eines entsprechend geteilten Papiers wurden die Eichkurven der Stoffe II bis VI ermittelt und mit deren Hilfe die quantitative Auswertung vorgenommen.

*Dioxyaceton.*

mm <sup>3</sup> aufgegeben	mg gelöster Stoff	Fleckengröße mm <sup>2</sup> (theoretisch)	Fleckengröße mm <sup>2</sup> gefunden	Gefundene Menge mg
20	0,62	550	535	0,588
20	0,62	550	565	0,665
25	0,77	600	590	0,744
25	0,77	600	615	0,812
30	0,93	650	630	0,868
30	0,93	650	645	0,913

*Brenztraubensäure.*

mm <sup>3</sup> aufgegeben	mg gelöster Stoff	Fleckengröße mm <sup>2</sup> (theoretisch)	Fleckengröße mm <sup>2</sup> gefunden	Gefundene Menge mg
15	0,52	700	680	0,49
15	0,52	700	690	0,50
20	0,70	800	760	0,63
20	0,70	800	795	0,70
25	0,87	950	920	0,84
25	0,87	950	980	0,87

*Milchsäure.*

15	0,75	640	655	0,775
15	0,75	640	665	0,80
20	1,00	800	770	0,95
20	1,00	800	825	1,05
25	1,25	1000	950	1,21
25	1,25	1000	940	1,18

*Glycerinaldehyd.*

mm <sup>3</sup> aufgegeben	mg gelöster Stoff	Fleckengröße mm <sup>2</sup> (theoretisch)	Fleckengröße mm <sup>2</sup> gefunden	Gefundene Menge mg
15	0,213	1380	1345	0,196
15	0,213	1380	1410	0,227
20	0,284	1550	1510	0,270
20	0,284	1550	1600	0,306
25	0,355	1740	1700	0,340
25	0,355	1740	1760	0,362

*Acetol.*

15	7,30	760	750	7,20
15	7,20	760	785	7,65
20	9,74	890	860	9,24
20	9,74	890	925	10,09
25	12,17	1040	1070	12,65
25	12,17	1040	1065	12,60

*Quantitative polarographische Bestimmung der Substanzen II, III, V und VI.*

Zur polarographischen Bestimmung der Eluate obiger Substanzen war es notwendig, die Gemische immer auf einem Papierstreifen doppelt laufen zu lassen. Die chromatographische Anordnung war genau dieselbe wie vorher beschrieben. Der eine Teil des Chromatogramms wurde dann gewöhnlich mit *m*-Phenylendiamin entwickelt und die Lage der einzelnen Substanzen angezeichnet. Nach dieser Markierung wurde der andere Teil des Papiers in Stücke geschnitten (nicht markiert), die Papierstreifen, auf denen sich nun immer nur eine Substanz befand, zwischen zwei Objektträger gelegt und in eine Kristallisierschale mit destilliertem Wasser gestellt. Durch die Kapillarwirkung wurde das Wasser hochgezogen und tropfte über ein überhängendes Stück in ein kleines Schälchen, wobei die zu bestimmende Substanz eluiert wurde<sup>5</sup>. Die Eluierung dauerte 12 bis 72 Stdn., anschließend wurde das Eluat polarographiert.

*Aufnahme der Eichkurven.*

Ein äquival. Teil der verwendeten Standardlösung (10 bis 50 mm<sup>3</sup> mit einem Gehalt von zirka 5 bis 30 mg/cm<sup>3</sup>) wurde mit der Grundlösung (0,05 n Tetramethylammoniumbromid-Lösung) auf ein genau bekanntes Volumen (meist 10 cm<sup>3</sup>) aufgefüllt, durch 6 Min. langes Einleiten von Stickstoff vom gelösten Sauerstoff befreit und unter den polarographisch üblichen Arbeitsbedingungen gemessen.

Verwendet wurde ein Polarograph „Sargent Heyrovsky Modell XII“ mit den von *W. Stoll*<sup>8</sup> angegebenen Zusatzeinrichtungen (Vorpotential, Galvanometerdämpfung usw.). Da die bearbeiteten Substanzen Halbwellenpotentiale besitzen, die negativer als -1 Volt sind, wurde in den meisten Fällen mit 1 Volt Vorpotential und 2 Volt Potential an der *Kohlrausch*-Walze gemessen. Die Galvanometerempfindlichkeit richtete sich jeweils nach den zu erwartenden Depolarisatorkonzentrationen.

Die Auswertung der Stufen erfolgte nach den in der Literatur angegebenen Methoden, wobei allerdings eine Korrektur des Halbwellenpotentials auf die Normal-Kalomel-Elektrode und nach  $i \cdot R$  unterblieb (bei einzelpolarographischen Aufnahmen vernachlässigbar klein).

*Aufnahme der Eluate.*

Die in einer Menge von 2 bis 10 ccm anfallenden Eluate aus der Papierchromatographie wurden entweder mit Grundlösung auf ein genau bekanntes Volumen aufgefüllt oder bei größeren Mengen mit festem Tetramethylammoniumbromid versetzt.

Die Brenztraubensäure wurde sowohl bei der Aufnahme der Standardlösung als auch der Eluate alkalisch vermessen. Zu diesem Zwecke wurde der zu bestimmenden Lösung außer den Grundelektrolyten ein gemessener Überschuß an Tetramethylammoniumhydroxyd-Lösung zugesetzt.

Das Eluat des Glycerinaldehyds, zirka 5 ccm, wurde mit der gleichen Menge 20%iger Schwefelsäure aus einem Kölbchen<sup>9</sup> destilliert und die ersten 5 ccm Destillat verwendet.

1. *Dioxyaceton* (HWP — 1,69 V, Gehalt 4,3 mg/ccm).

El.-Zeit Stdn.	mm <sup>3</sup>	St. H. mm E/50	Ermittelter Gehalt mg	Wahrer Gehalt mg	Erfasste Menge %
12	25	3,4	0,072	0,107	67,3
12	25	3,2	0,068	0,107	63,5
12	50	7,0	0,148	0,215	68,8
12	50	6,3	0,133	0,215	61,9
24	20	4,0	0,081	0,086	94,2
24	50	9,0	0,181	0,215	88,8
24	50	8,8	0,187	0,215	87,0
24	100	17,0	0,360	0,430	83,7
48	20	4,2	0,085	0,086	98,8
48	20	4,1	0,083	0,086	96,5
48	25	5,0	0,106	0,107	99,2
48	25	4,8	0,102	0,107	95,3
48	50	10,5	0,212	0,215	98,4

2. *Brenztraubensäure* (HWP — 1,49 V, Gehalt 35,6 mg/ccm).

El.-Zeit Stdn.	mm <sup>3</sup>	St. H. mm E/50	Ermittelter Gehalt mg	Wahrer Gehalt mg	Erfasste Menge %
12	20	12,4	0,164	0,712	23,0
12	20	11,0	0,145	0,712	20,6
18	20	16,0	0,211	0,712	29,7
24	20	24,0	0,316	0,712	44,4
72	20	48,0	0,632	0,634*	99,6
72	20	46,5	0,613	0,634	96,7

\* Neue Lösung verwendet.

Das Destillat wurde mit 0,1 n Tetramethylammoniumbromid-Lösung auf 10 ccm aufgefüllt und zirka 100 mg festes o-Phenylendiamin zugesetzt und mit Stickstoff vom Sauerstoff befreit. Dann wurde unter Stickstoff 15 Min. stehen gelassen und anschließend vermessen. Unter denselben Bedingungen wurde mit einer Glycerinaldehydlösung bekannten Gehaltes die Eichkurve aufgenommen.

3. *Acetol* (HWP — 2,0 V, Gehalt 0,487 g/ccm).

El.-Zeit Stdn.	mm <sup>3</sup>	St. H. in mm, E/50	Ermittelter Gehalt mg	Wahrer Gehalt mg	Erfasste Menge %
12	10	282	3,54	4,87	72,7
12	10	253	3,18	4,87	65,3
12	5	160	1,96	2,43	80,6
12	15	345	4,32	7,30	59,2
24	5	171	2,14	2,43	88,2
24	5	178	2,23	2,43	91,8
24	10	348	4,36	4,87	79,5
24	15	450	5,62	7,30	68,3
48	5	192	2,40	2,43	98,7
48	5	195	2,44	2,43	100,5
48	10	386	4,85	4,87	99,7
48	15	565	7,07	7,30	96,8

4. *Glycerinaldehyd* als Methylchinoxalin vermessen (HWP — 0,95 bis — 1,0 V, Gehalt 13,03 mg/ccm).

El.-Zeit Stdn.	mm <sup>3</sup>	St. H. mm E/50	Ermittelter Gehalt mg	Wahrer Gehalt mg	Erfasste Menge %
12	10	3,4	0,088	0,130	68,0
12	10	3,7	0,096	0,130	74,0
12	20	6,2	0,161	0,260	62,0
12	20	6,8	0,177	0,260	68,0
24	10	4,3	0,112	0,130	85,8
24	15	6,8	0,177	0,195	95,5
24	20	8,0	0,208	0,260	80,0
24	20	8,2	0,214	0,260	82,2
48	10	4,9	0,127	0,130	98,0
48	10	5,0	0,130	0,130	100,0
48	15	7,4	0,192	0,195	98,6
48	20	10,1	0,263	0,260	101,2
48	20	9,9	0,258	0,260	99,3