

Studium der Reduktion von Resazurin

Von

E. Ružička, J. Adámek und J. Andree

Aus dem Institut für Organische Chemie der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Palacký-Universität in Olmütz (ČSSR)

Mit 4 Abbildungen

(Eingegangen am 19. Juli 1966)

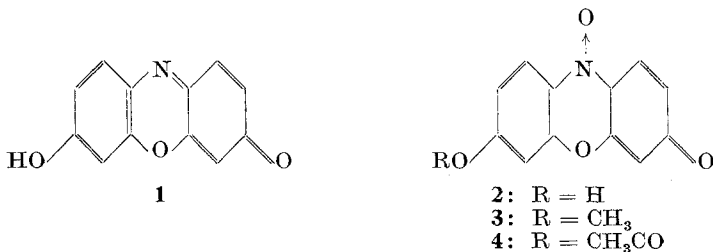
In dieser Arbeit wurden Schlußfolgerungen über den simultanen Verlauf der beiden Reduktionsphasen von Resazurin überprüft.

Weiters wurden Bedingungen für die quantitative titanometrische Bestimmung von Resazurin und seiner Derivate ermittelt.

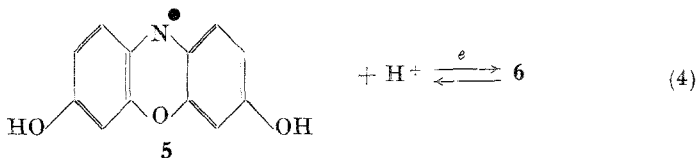
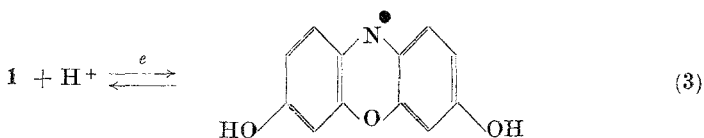
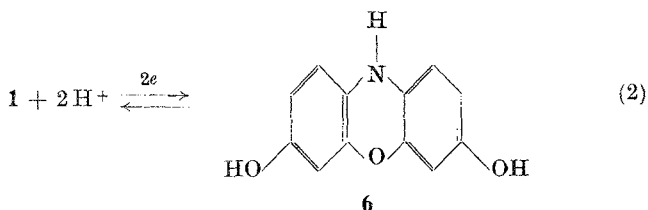
The conclusions about the simultaneous course of reduction of Resazurin to Resorufin and Resorufin to Dihydroresorufin were verified in this work.

The conditions for the quantitative titanometric determination of Resazurin and its derivatives were found.

In einer vorangegangenen Arbeit¹ haben wir uns mit der Reduktion von Resorufin [7-Hydroxyphenoxazon-(3)] (**1**) befaßt und die Basis zum Studium der Reduktion seines N-Oxides (Resazurin = 7-Hydroxyphenoxazon-(3)-10-oxid, **2**) und seiner Derivate, wie Methylätherresazurin (**3**) und o-Acetylresazurin (**4**) geschaffen.



¹ E. Ružička, J. Adámek und J. Andree, Mikrochim. Acta [Wien], 1966, 975.



In den bisherigen Arbeiten, welche diese Problematik betreffen, werden zwei fundamentale Phasen der Reduktion erwähnt², wobei die zweite Phase (Gl. 2) unter bestimmten Verhältnissen zweistufig über das blaue intermediäre Stadium des Semichinons **5** vor sich geht. Dieses wird weiter zur Leukoform Dihydroresorufin (**6**) reduziert (Gl. 3, 4). Dieser Vorgang ist vollkommen reversibel.

Die erste Phase stellt einen irreversiblen Vorgang vor, Abspaltung des Sauerstoffatoms, das semipolar an das Stickstoffatom gebunden ist. Eine Arbeit von *Twigg*² befaßte sich mit der potentiometrischen Erforschung der Resazurinreduktion bei pH 6—7; er arbeitete auch Methoden zur Bestimmung von Resazurin neben Resorufin aus. Seine Feststellung, daß die zweite Phase der Reduktion simultan mit der ersten vor sich geht, ist sehr wichtig; er weist nachdrücklich darauf hin, daß seine Folgerungen zumindest im erwähnten pH-Bereich gültig sind.

In der vorliegenden Arbeit haben wir *Twiggs* Folgerungen über die beiden simultan vor sich gehenden Phasen bestätigt und auf extrem saure Lösungen bis in das negative pH-Gebiet erweitert. Weiter waren wir bestrebt, die Bedingungen zur quantitativen titanometrischen Bestimmung von Resazurin und dessen Derivaten zu finden.

Verwendete Reagentien und Apparaturen

Zur Reduktion wurde 0,01 *n*-TiCl₃ in Chlorwasserstoffsäure mit der Endkonzentration *n*/₁ verwendet, die in automatischen Büretten für Titration in

² R. S. *Twigg*, Nature [London] **155**, 401 (1945).

einer inerten Atmosphäre unter Verwendung von Wasserstoff aufbewahrt und potentiometrisch gegen $0,01n\text{-}(\text{NH}_4)\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ⁵ gestellt wurde³. Bei potentiometrischen Messungen wurde eine blanke Platinelektrode und eine gesättigte Kalomelektrode verwendet. Die Potentialdifferenz wurde mit dem Kompensationsgerät Ionoskop gemessen; die Temp. lag bei allen Messungen bei $24 \pm 1^\circ\text{C}$.

Zum Ansäuern hat man konz. HCl verwendet, die Titration ist nach ausreichendem Durchleiten von CO_2 im Dunkeln durchgeführt worden. Alle Reagentien waren p. a.-Qualität (Firma Lachema n. p. [VEB]). Die Reinheit der Farbstoffe wurde chromatographisch (Silikagel bzw. Papierchromatographie) geprüft⁶.

Titrationvorgang

Für die Titration hat man 50 oder 100 ml $10^{-4}m$ -Lösungen in 96proz. Alkohol, bei der Titration des Natriumsalzes des Resazurins 25 ml $10^{-3}m$ -Lösung verwendet. Nur für eine Meßreihe hat man Resazurin-Natriumsalz in H_2O gelöst.

Vor der Titration wurde die nötige Menge Salzsäure zugesetzt. Durch den Inhalt des Kolbens ließ man 5 Min. reines CO_2 sprudeln; während der Titration wurde magnetisch gemischt.

Die spektrometrischen Messungen wurden mit dem Beckman-DU (nur im Bereich von 320 bis 700 nm) gemessen.

Die Potentiale wurden nach der Zugabe des Titrationsreagens in gleichen Zeitabständen abgelesen.

Um die Farbumschläge in den verdunkelten Kolben beobachten zu können, wurde die Zufuhr von CO_2 unterbrochen, durch Pressen und wiederholtes Loslassen eines Gummischlauches ein wenig Lösung in die gläserne Gasleitung bis über das Niveau des verdunkelten Kolbens angesaugt, wieder Gas eingeleitet und dadurch der angesaugte Teil der Lösung in die titrierte Lösung zurückgetrieben.

Potentiometrische Bestimmung von Resazurin mit TiCl_3

Aus den Gleichungen (1)—(4) geht hervor, daß die vollständige Reduktion mit dem Austausch von 4 Elektronen verbunden ist.

$$\begin{array}{l} 1 \text{ ml } 0,01n\text{-TiCl}_3 \text{ entspricht: } 0,6295 \text{ mg } 2 \\ \text{oder} \quad \quad \quad 0,6075 \text{ mg } 3 \\ \text{oder} \quad \quad \quad 0,6780 \text{ mg } 4 \end{array}$$

Die Präparate 3 und 4 wurden von Mitarbeitern unseres Instituts bereitet⁶. Das Präparat 2 war ein Erzeugnis der Firma Lachema n. p. (VEB), chromatographisch vollkommen rein; anfangs wurde ein Na-Resazurinsalz verwendet, das etwa 22% Na_2CO_3 enthielt.

³ R. Flatt und F. Sommer, Helv. Chim. Acta **25**, 684 (1942).

⁴ W. M. Thornot und A. E. Wood, Ind. Engng. Chem. **19**, 150 (1927).

⁵ E. Zintl und A. Rauch, Z. Anorg. Chem. **146**, 281 (1925).

⁶ E. Ružička und J. Juřina, Mh. Chem. **97**, 130 (1966).

Eine Zusammenfassung von Titrationsresultaten und den Bedingungen, welche eingehalten wurden, gibt Tab. 1.

Tabelle 1

Vers.-No. und Substanz	Norm. der HCl	Einwaage, mg	gefunden, mg	Fehler %	Anmerkung
1. 3	0,25	2,43	2,21	— 9,0	Bereitet und momentan bei Tageslicht bearbeitet
2. 3	0,25	2,43	2,11	— 13,2	Bearbeitet nach 30 Min. im Licht
3. 3	0,25	2,43	1,22	-- 49,7	Die Lösung stand den ganzen Tag ohne Ansäuerung im Licht
4. 3	0,1	2,43	2,44	— 0,33	Bereitung und Verarbeitung bei Dunkelheit
5. 3	0,1	2,43	2,43	0,00	dto.
6. 3	0,25	2,43	2,40	— 1,23	
7. 3	0,5	1,216	1,192	-- 1,97	dto.
8. 4	0,1	1,356	1,346	— 0,74	dto.
9. 4	0,1	2,712	2,70	-- 0,44	dto.

Durchführung der spektrophotometrischen Messungen

Die spektrophotometrischen Messungen betrafen die Lösungen von $10^{-4}m$ -Resazurin (2) und Methylätherresazurin (3); zum Vergleich sind auch Lösungen von Resorufin (im Sichtbaren) gemessen worden.

Ein besonderer Vorgang mußte bei Messungen von Zwischenprodukten der Resazurinreduktion und Resorufinreduktion eingehalten werden, da diese schon bei den normalen Meßbedingungen zu leicht mit Luftsauerstoff reagierten⁸. Um festzustellen, in welchem Ausmaß die einzelnen Zwischenprodukte in verschiedenen Stadien der Reduktion vorhanden sind (deren Koexistenz durch die Simultaneität der Vorgänge ermöglicht wird), haben wir einerseits den Gesamtverbrauch an $TiCl_3$ (für die vollständige Reduktion des Resazurin) zur Leukoform (Dihydroresorufin, 6) festgestellt, zu anderen Proben nur einen gewissen Teil Titrationsreagens zugefügt, um ein bestimmtes Reduktionsstadium zu erreichen; die übrigen Titrationsbedingungen wurden unverändert beibehalten. Aus diesen Lösungen hat man mit Hilfe einer mit CO_2 -Gas gefüllten Pipette eine Probe abgemessen und in eine durch CO_2 luftfrei gemachten Küvette, die durch einen Gummiverschluß verschlossen wurde, gebracht.

In ähnlicher Weise hat man dann Resorufin (1) bearbeitet, welches vergleichbare Spektren lieferte (Abb. 2).

Denselben Vorgang hat man bei der Ermittlung von Abhängigkeit der simultan verlaufenden Reduktion von der Konzentration der Säure, die man im voraus in die Küvette gegeben hat, angewandt.

⁸ E. Ruzička, Chem. listy 51, 1814 (1956).

Resultate und Diskussion

Die auffallendste Erscheinung bei der Titration von Resazurin (2) ist der anomale Verlauf der Titrationskurven (Abb. 3). Die ersten Stadien der

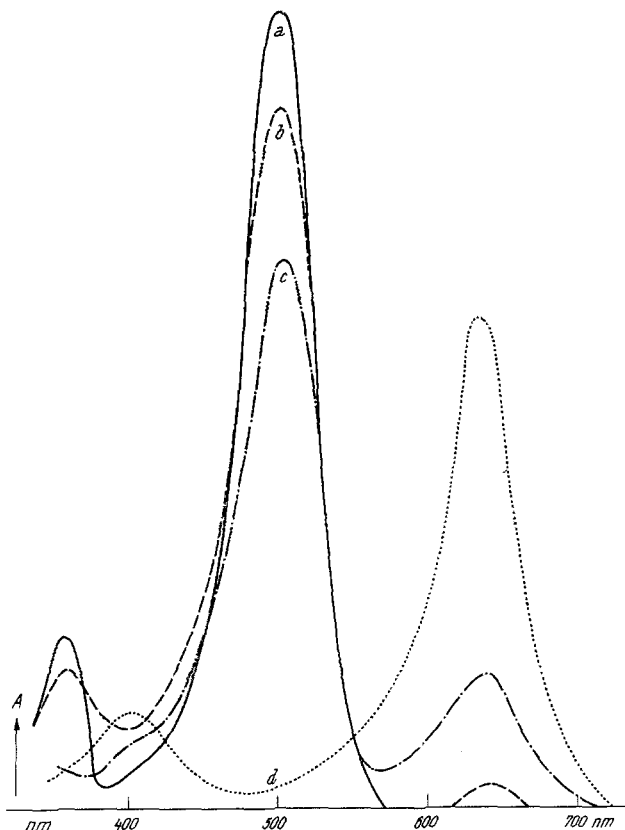


Abb. 1. Spektrum der Reduktionszwischenstufen von Resazurin (2) im visuellen Bereich. 25 ml $10^{-4}m$ -Lösung, Acidität eingestellt auf $2n$ -HCl. Titration mit $0,01n$ -TiCl₃.

- Kurve (a) ————— Spektrum der total oxydierten Form
 Kurve (b) - - - - - Spektrum nach $\frac{1}{4}$ Reduktion
 Kurve (c) - · - · - · Spektrum nach $\frac{1}{2}$ Reduktion
 Kurve (d) · · · · · Spektrum nach $\frac{3}{4}$ Reduktion

Reduktion verlaufen bei fast konstantem Potential, so daß sich auf der Titrationskurve ein waagrechtes Plateau bildet. Auf ähnliche Erscheinung macht Čihálek⁹ bei der potentiometrischen Titration von ClO₃⁻, BrO₃⁻ und JO₃⁻ mit Titaniumchlorid aufmerksam. Bei der potentiometrischen Titration von Sb^{III} mit CrSO₄ stellt er zusammenfassend fest, daß man immer dann diese Erscheinung wahrnimmt, wenn es zur Bildung von nichtionogenen Formen kommt.

⁹ J. Čihálek, Potentiometrie, Praha (1961), S. 566, 589.

Bei der Titration von Resazurin (**2**) nehmen wir an, daß der horizontale Teil der Kurve der irreversiblen Phase der Reduktion entspricht, wo es zur Abspaltung des N—Oxid-Sauerstoffs nach Gl. (1) kommt. Die bisherigen Arbeiten nahmen eine mehr oder weniger sofortige Abspaltung von Sauer-

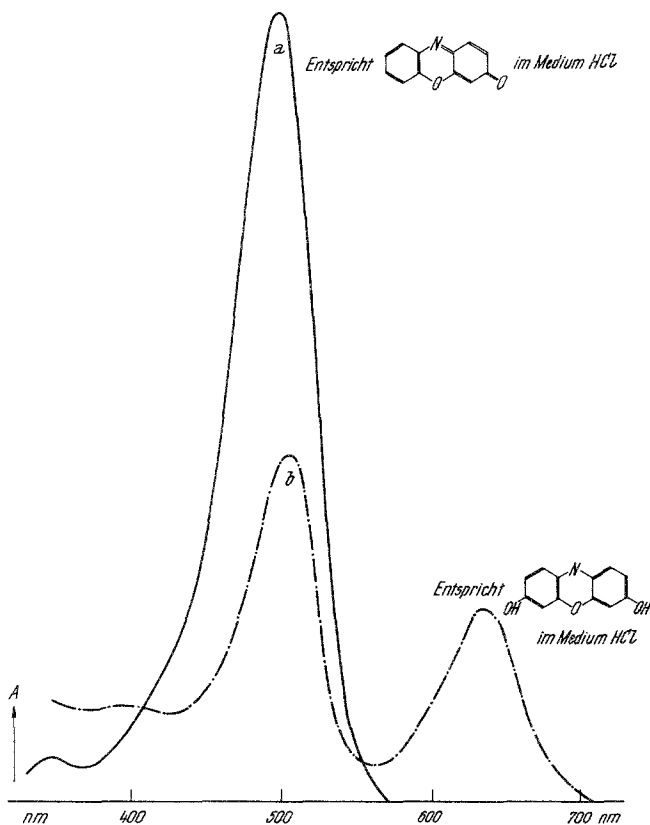


Abb. 2. Spektrum der Reduktionzwischenstufen von Resorufin (**1**) im visuellen Bereich. 25 ml $10^{-4}m$ -Lösung. Acidität korrigiert auf $2n$ -HCl

Kurve (a) ————— Spektrum der total oxydierten Form
 Kurve (b) - - - - - Spektrum nach $\frac{1}{2}$ Reduktion

stoff aus Resazurin beim Ansäuern an unter Bildung von Resorufin^{10, 11, 12}. Folgende Tatsachen seien aber dieser Schlußfolgerung gegenübergestellt: Sollte sich der Sauerstoff sofort nach dem Ansäuern abspalten, könnte man nur dann bei mehreren Proben die gleichen Titrationsresultate erreichen, wenn der freigewordene Sauerstoff quantitativ in der Probe bleiben würde,

¹⁰ P. Weselsky, Ann. Chem. **162**, 273 (1872).

¹¹ G. Heller, W. Dietrich und R. Reichardt, J. prakt. Chem. **139** (1928), **118**,

¹² R. Nietzski, A. Dietze und H. Mäckler, Ber. dtsch. chem. Ges. **22**, 3023 (1889).

oder wenn man ihn quantitativ aus der Probe entfernte. Wir versuchten, den gegf. freigemachten Sauerstoff quantitativ oder teilweise zu verdrängen, indem wir die angesäuerte Lösung in einem luftleeren Exsiccator aufbewahrten; nach ca. 12stdg. Stehen (im Dunkeln) wurden die gleichen Titrationsresultate festgestellt wie bei einer momentan titrierten Probe. Auch der Versuch, den freigemachten Sauerstoff durch Durchleiten von CO₂ auszutreiben, hat nicht zur Verminderung des Verbrauches bei der Titration geführt, ebensowenig halbstündiges Sieden der mit HCl angesäuerten Resazurinlösung (im Dunkeln).

Erst 5stdg. Kochen der angesäuerten Lösung von Resazurin-Natriumsalz (im Dunkeln) führte zur Abspaltung von N-Oxid-Sauerstoff (bis zu 25%). Abspaltung von Sauerstoff und damit auch die Zersetzung von Resazurinderivaten wird von einem Farbumschlag begleitet (beim Methylätherresazurin (3) von orangerot auf orange-gelb, was auch visuell zu beobachten ist. Dagegen weist das Spektrum einer alkoholischen Lösung von Methylätherresazurin (3) nach 1stdg. Kochen im Dunkeln keinen Unterschied gegenüber dem der ursprünglichen Probe auf.

Man muß hervorheben, daß das Licht auf die Abspaltung von Sauerstoff aus dem Resazurin einen großen Einfluß ausübt, was sich besonders bei substituierten Derivaten (3), Tab. 1, Fall 1—3, zeigte. Deshalb haben wir meistens unter Lichtabschluß gearbeitet. Der Lichteinfluß auf den Reduktionsvorgang wird gegenwärtig eingehend vom Mitarbeiter-Kollektiv unseres Instituts studiert.

Auf Grund dieser Tatsachen kann man sagen, daß die spontane Abspaltung von N-oxidischem Sauerstoff nach dem Ansäuern sehr langsam fortschreitet. Dies macht es möglich, bei Erfüllung der vorgeschriebenen Bedingungen Resazurin und seine Derivate quantitativ titanometrisch zu bestimmen, wahrscheinlich auch andere N-Oxide, wie wir z. B. am N-Oxid des Benzo[*a*]phenoxazons nachgewiesen haben¹³.

Auf Grund unserer Befunde nehmen wir an, daß es zur Abspaltung von N-Oxid-Sauerstoff erst während der Titration kommt.

Wie wir schon angeführt haben, ist es möglich, die Vorgänge in dem System durch die Gleichungen (1)—(4) auszudrücken, wobei Simultaneität des Geschehens in Betracht gezogen wird.

Diese Reaktion ist irreversibel. In schwach sauren Lösungen (0,1 *n*-HCl) gibt es keine zweckmäßigen Bedingungen weder für Semichinon (5) nach Gl. (3), noch kann Reaktion nach Gl. (4) eintreten. Bis zum Stadium der Halbreduktion verläuft die Reaktion meistens nach Gl. (1). Mit dieser Reaktion parallel, jedoch in geringem Ausmaß, verläuft die Reaktion nach Gl. (2), weil der erste Potentialsprung den Punkt der Halbreduktion übertrifft.

¹³ E. Ružička, nicht publiziert.

Die Färbung der bis zur Hälfte reduzierten Probe ist orangegelb. Diese Farbe ist den Resorufinderivaten in saurem Medium eigen. Von der Abwesenheit (oder von einer belanglosen Menge) des Semichinons zeugt auch die oben angeführte Verfärbung, da die Anwesenheit von Semichinon als

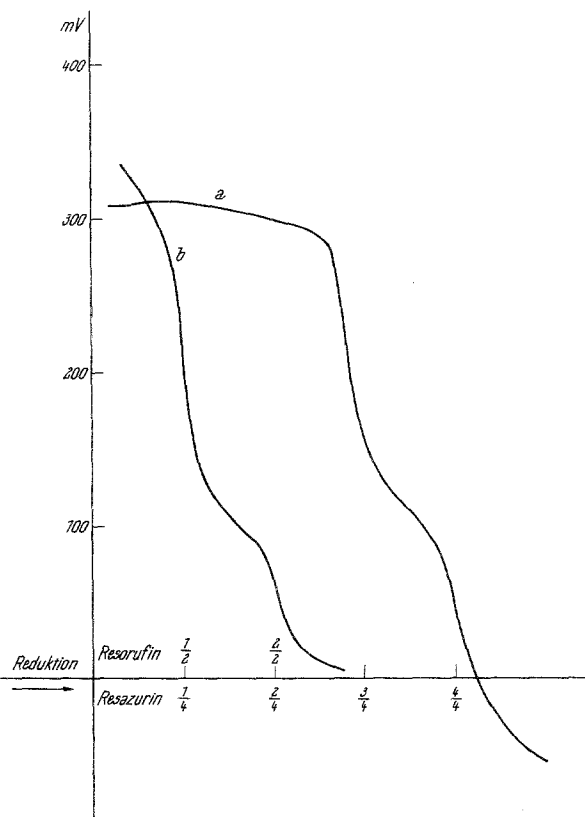


Abb. 3. Potentiometrische Kurven von Resazurin (2) und Resorufin (1); 50 ml $10^{-4}m$ -Lösung. Acidität der Lösung korrigiert auf $3n$ -HCl. Titriert mit $0,01n$ -TiCl₃

Kurve (a) Resazurin

Kurve (b) Resorufin

Radikal mit ungepaarten Elektronen den Anlaß zu einer intensiv blauen Färbung gibt.

Der Reaktionsverlauf vom Stadium der Halbreduktion bis zum Ende der Reduktion wird durch die Gl. (2) und durch die zweite Hälfte der Kurve *a* (Abb. 3) ausgedrückt.

Bei steigender Konzentration der Säure kommt die Reaktion (3) zur Geltung auf Kosten der Reaktion (1). Resazurin (2) als solches hält sich geraume Zeit in der Mischung, demzufolge wird der Potentialsprung

weiter, hinter die Halbreduktion, verschoben; aus diesem Grunde ist das Plateau auf der Kurve länger (Abb. 4, Kurve b, c).

Dies haben wir in 0,05*n*-, 3*n*- und 6*n*-HCl geprüft. In den letzten zwei Fällen war die Färbung im Stadium der Halbreduktion violett-blau gewesen,

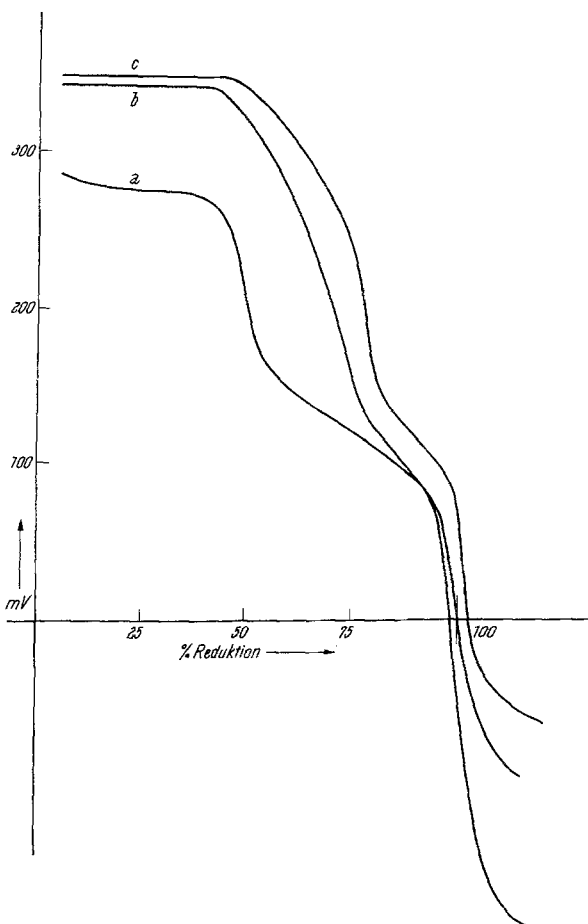


Abb. 4. Potentiometrische Reduktionskurven von Resazurin bei verschiedener Konzentration an HCl. 50 ml 10^{-4} wäsr. Lösung. Durch Zugabe der ber. Menge von konz. HCl wurde die Acidität der Lösung korrigiert. Titriert mit 0,01*n*-TiCl₃.

Kurve (a) in 0,1*n*-HCl

Kurve (b) in 3*n*-HCl

Kurve (c) in 6*n*-HCl

was bereits auf Semichinon hinweist. Beim ersten Potentialsprung, welcher in 3*n*-, noch mehr in 6*n*-HCl weiter hinter die Halbreduktion rückte, war die Färbung schon rein blau. Wie wir in unserer vorangegangenen Arbeit festgestellt haben¹, wird mit steigender Acidität der Ablauf der Reaktion (4) gehemmt; Semichinon wird wahrscheinlich stabilisiert und

außerdem wird die Reduktionsfähigkeit von $TiCl_3$ mit steigender Acidität herabgesetzt. Die Lösung wird auch durch Überschuß von Titrationsreagens nicht völlig entfärbt.

Zu den erwähnten Schlußfolgerungen sind wir auf Grund von spektrophotometrischen Messungen in verschiedenen Reduktionsstadien gelangt, wo aus der Existenz der Maxima und ihren Höhen zu ersehen ist, welche Reaktionsprodukte und in welchen beiläufigen Mengen sie vertreten sind (Abb. 1, 2).

Eine genaue quantitative Auswertung der Spektren konnte nicht vorgenommen werden, weil es nicht gelungen ist — trotz der angewandten Maßnahmen — die Zwischenprodukte im ursprünglichem Stadium während der Messungen zu stabilisieren.

Trotzdem haben uns diese Resultate gezeigt, wie die von *Twigg*² beschriebene Simultaneität der Vorgänge durch Variation der Konzentration aus Säure beeinflusst wird und welche Zwischenprodukte in den verschiedenen Reduktionsstadien anzutreffen sind.

Die gewonnenen Erkenntnisse sind auch für die quantitative titanometrische Bestimmung von Methylätherresazurin (3) und o-Acetylresazurin (4) benützt worden.

Die Resultate wurden in Tab. 1 (S. 1561) zusammengefaßt.