

ab (s. a.<sup>1, 12</sup>)). Der Übergang des metastabilen Dihydrates in den stabilen Apatit verläuft wegen der sehr kleinen Löslichkeitsunterschiede äußerst langsam. In Phosphorsäure-reicheren Lösungen, rechts von  $U_2 \dots c'$ , scheidet sich erst das  $CaHPO_4 \cdot 2 H_2O$  allein aus, da die Bildung des  $CaHPO_4$  sehr langsam ist, bei höheren Temperaturen tritt er rascher auf.

Aus den gleichen Gründen ist es gelungen, die metastabilen Äste des  $CaHPO_4 \cdot 2 H_2O$  zu bestimmen. Den Übergang des Dihydrates nach Impfen mit dem Anhydrid in diesen konnte bei 25 °C in erträglichen Zeiten in Lösungen verfolgt werden, die mehr als etwa 0,0085 Mol/l an freier Phosphorsäure enthielten, eine Bestätigung für die interpolierte Lage des Übergangspunktes bei 25 °C. Beim Erwärmen von Bodenkörperlösungen des bei 25 °C stabilen Gebietes des  $CaHPO_4 \cdot 2 H_2O$  wandelt sich dieses unter Zerfall der Kristalle in Apatit um (im Bild 2 entspricht das einem fast senkrechten Heruntergehen in das Apatitgebiet hinein). Beim trocknen Erhitzen dagegen behält es, trotz Entweichen allen Wassers, die äußere Kristallform bei.

Die sehr viel kleinere Löslichkeit des Fluorapatites gegenüber der des Hydroxylapatites muß die Existenzgebiete der Dicalciumphosphate beträchtlich einengen. Wissenschaftlich und technisch wäre es von Interesse festzustellen, ob jene ganz wegfallen, oder bei welchen Temperaturen dies der Fall ist, und ob dann der Fluorapatit in Paragenese mit dem Monocalciumphosphat tritt.

In einer kürzlich erschienenen Arbeit von B. Kurmies<sup>14</sup>) befinden sich Werte für die Löslichkeit des Dicalciumphosphates bei Raumtemperatur (S. 15), die umgerechnet sich bestens in unsere Löslichkeitsisotherme einfügen:

Mole/l	Ca	PO <sub>4</sub>
	0,00074	0,00077
	0,00113	0,00182
	0,00136	0,00229
	0,00135	0,00226

<sup>14</sup>) B. Kurmies: Die Phosphorsäure 13, 57–100 [1953].

Der erste Wert entspricht fast dem einer kongruenten Löslichkeit des Dihydrates. Die Lösungen sind durch „Hydrolyse“ des Dihydrates erhalten worden, die Zunahme des Verhältnisses  $PO_4 : Ca$  zeigt an, daß Apatit ausgefallen ist; aber dies beeinträchtigt die Löslichkeitswerte des Dihydrates nicht, solange seine anwesende Menge bei seinem raschen Inlösungsgehen ausreicht, um die Einstellung der Sättigung zu gewährleisten. Beim Siedepunkt fand Kurmies, bei gleicher Ca-Konzentration, die  $PO_4$ -Konzentration etwas größer als bei Raumtemperatur, was der Erwartung entspricht. Bodenkörper war in einem Falle offenbar das Dihydrat, in zwei Fällen das Anhydrid, stets neben dem gebildeten Apatit.

Der Verlauf der Hydrolyse des Dicalciumphosphates läßt sich, einfacher als geschehen, auf Grund der Tatsache erläutern, daß, wie gezeigt wurde, die Löslichkeitsisotherme der Dicalciumphosphate zufällig nahe die Neigung 1 Ca : 2  $PO_4$  (in Molen) hat.

Die Aufklärung der stabilen und der metastabilen Lösungsgleichgewichte von drei der Calciumphosphate dürfte manche der bisher noch bestehenden Unsicherheiten über das Auftreten dieser Bodenkörper beseitigen, und die erforderlichen Anhaltspunkte geben zu einer sicheren Führung für die technische Behandlung dieser Phosphate.

Die Arbeit konnte durch Herrn Knütter in den Laboratorien der Osram-Studiengesellschaft ausgeführt werden, wofür wir dieser und insbesondere Herrn G. Kressin sehr zu Dank verpflichtet sind.

Eingeg. am 27. August 1953 [A 525]

## Quantitative Bestimmung reduzierender Zucker durch Papierchromatographie sowie eine Anwendung zur Mikrobestimmung der Blutzucker

Von Prof. Dr. K. WALLENFELS, E. BERNT und G. LIMBERG

Aus dem biochemischen Laboratorium Tutzing der C. F. Boehringer & Soehne G. m. b. H. Mannheim-Waldhof

Zucker, die papierchromatographisch getrennt worden sind, können entweder durch Reaktion mit ammoniakalischer Silbernitrat-Lösung und anschließende direkte Photometrierung der Silberflecken oder durch Reduktion von Triphenyl-tetrazoliumchlorid zu Formazan, Elution und Kolorimetrierung quantitativ bestimmt werden. Die Mikrobestimmung von Blutzucker nach dem letztgenannten Verfahren wird ausführlich geschildert.

In der Natur kommen die Zucker stets vergesellschaftet vor, sei es, daß mehrere Zuckerarten nebeneinander vorliegen oder auch andere Naturstoffe sie begleiten, die bestimmte Eigenschaften mit diesen gemeinsam haben, so daß die Zuckerbestimmung gestört wird. Auch bei der Hydrolyse von reinen Oligosacchariden und Polysacchariden enthalten die Hydrolysate einerseits die verschiedenen sie aufbauenden Monosaccharide und andererseits Oligosaccharide, welche Bauelemente sind, z.T. auch erst durch Gruppenübertragung bei der Spaltung der polymeren Verbindungen gebildet werden<sup>1</sup>). Zur quantitativen Bestimmung der einzelnen Zucker in solchen Gemischen kann man entweder eine Reaktion benutzen, die nur der betreffende Zucker eingeht, z. B. eine sehr spezifische Farb-reaktion<sup>2</sup>), oder man trennt das Gemisch in die einzelnen Komponenten auf und mißt deren Menge durch eine der

allgemeinen Zuckerreaktionen. Da es nur für die wenigsten Zucker genügend spezifische Reaktionen gibt, muß meist der zweite Weg eingeschlagen werden. Eine Trennmethode, die es ermöglicht, die Komponenten des Gemisches vollständig und verlustlos voneinander zu trennen, ist die Papierchromatographie.

Für die quantitative Bestimmung von Zuckern in Papierchromatogrammen wurde von Hirst und Jones<sup>3</sup>) ein Verfahren entwickelt, bei dem die Zucker aus dem Papierchromatogramm einzeln ausgewaschen werden müssen ohne daß sie vorher gefärbt und sichtbar gemacht werden. Nach unseren Erfahrungen läßt es sich benützen, wenn das zu analysierende Gemisch nur aus wenigen Komponenten besteht, welche sich in ihrem  $R_f$ -Wert erheblich unterscheiden. Die quantitative Trennung von Zuckern mit geringen Unterschieden im  $R_f$ -Wert, wie Glucose-Fructose,

<sup>1</sup>) K. Wallenfels, E. Bernt u. G. Limberg, Liebigs Ann. Chem. 579, 113 [1953].

<sup>2</sup>) Z. Dische: Phosphorus Metabolism; S. 173–175, Baltimore 1951.

<sup>3</sup>) E. L. Hirst u. J. K. N. Jones, J. Chem. Soc. [London] 1949, 1659. Vgl. insbes. den Aufsatz: „Die Papierchromatographie der Zucker“, von F. Cramer, diese Ztschr. 62, 73 [1950].

Glucose-Galaktose, Isomaltose-Maltotriose, Lactose-Lactobiose oder Lactobiose-Galaktobiose, ist daher unmöglich. Es war somit erforderlich, die zur Bestimmung der Zucker benützte Reaktion im Papier selbst auszuführen und die Reaktionsprodukte, die nunmehr sichtbar sind, entweder direkt im Papier oder nach ihrer Elution zu bestimmen. Es haben sich bei unserem Problem nur zwei Verfahren bewährt: 1.) Die Reaktion mit ammoniakalischem Silbernitrat und anschließende direkte Photometrie der Silberflecke, 2.) die Reduktion von Triphenyl-tetrazoliumchlorid zu Formazan, Ausschneiden der gebildeten Farbflecke, Elution und kolorimetrische Bestimmung des Farbstoffes<sup>4)</sup>.

Direkte Photometrie der Silberflecke

Eine Reaktion im Papier eignet sich zur quantitativen Auswertung, wenn sie weitgehend vollständig verläuft, d. h. in unserem Falle, daß aller im Fleck enthaltene Zucker mit dem Reagenz sichtbar reagiert. Diese Bedingung ist bei den meisten Nachweisreaktionen für Zucker nicht erfüllt. Die Empfindlichkeit der Nachweisreaktionen ist sehr verschieden. Man kann die Empfindlichkeit der Reaktionen bei gleichen Zuckermengen direkt an der Größe der gebildeten Flecke ermes sen, weil die Konzentration des Zuckers im gewanderten Fleck von der Mitte gegen die Peripherie abnimmt. Je empfindlicher eine Reaktion ist, desto größer ist der Fleck, der nach dem Sichtbarmachen des Zuckers entsteht.

In jeweils drei Parallel-Proben wurden 50  $\gamma$  Glucose mit Butanol-Pyridin-Wasser chromatographiert und die Flecken nach verschiedener Art sichtbar gemacht. Die Größen der Flecke wurden planimetriert (Tabelle 1). Die Folge

Entwicklungsmethode	Ausgemessene Fläche des sichtbaren Fleckes in cm <sup>2</sup>		
AgNO <sub>3</sub> -NH <sub>3</sub> <sup>5)</sup> .....	9,1	9,2	9,8
TTC <sup>6)</sup> .....	6,8	6,4	6,4
Anilinphthalat <sup>6)</sup> .....	3,1	3,1	3,1
im UV-Licht .....	7,0	6,8	6,8
Phenylendiamin <sup>7)</sup> .....	2,7	2,5	2,5
Benzidin <sup>8)</sup> .....	5,2	4,8	4,8

Tabelle 1

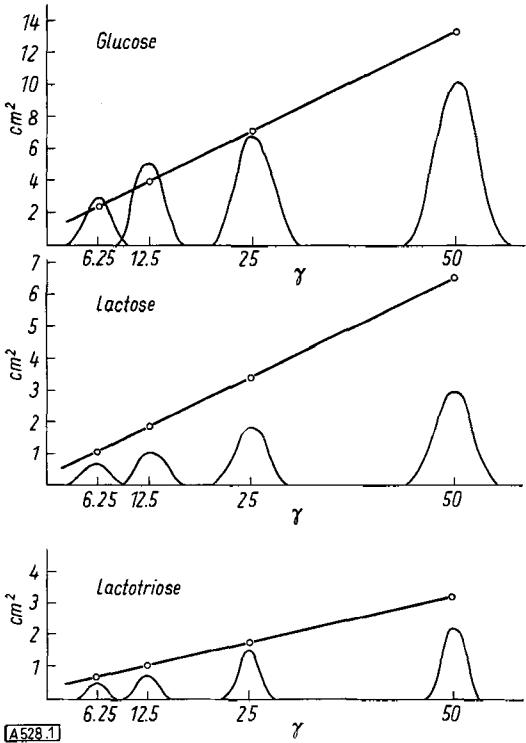
dieser verschiedenen Empfindlichkeit der Nachweisreaktionen ist, daß Chromatogramme eines Zuckergemisches, das unter gleichen Bedingungen chromatographiert wurde, je nach der benützten Nachweisreaktion einmal scharf voneinander abgetrennte kleinere Flecken zeigen oder größere, welche evtl. ohne scharfe Abtrennung ineinander übergehen. Für den qualitativen Nachweis und die Bestimmung eines R<sub>F</sub>-Wertes eignet sich daher oft eine weniger empfindliche Reaktion besser als die empfindlichste. Für die quantitative Bestimmung wird jedoch durch unvollständige Reaktionen die Methode mit einem zusätzlichen und im Umfang ungewissen Fehler belastet. Man muß es daher anstreben, nach Möglichkeit den gesamten Zucker, der im Chromatogramm enthalten ist, in sichtbarer Reaktion erfassen zu können.

Die hohe Empfindlichkeit der Silbernitrat-Reaktion wird nur dann erreicht, wenn man die Reaktion nicht nach Partridge<sup>9)</sup> im trockenen Papier durch Erhitzen des mit

Silbernitrat-Ammoniak besprühten Chromatogramms im Trockenschrank ausführt, sondern in der von uns angegebenen Weise<sup>5)</sup> durch Erhitzen des kurz getrockneten Chromatogramms im strömenden Wasserdampf von 100 °C. Bei dieser Ausführung reagieren zudem die Zucker sehr schnell (10 sec), bevor das Papier sich selbst in hohem Maße verfärbt hat. Die geringe Dunkelfärbung des Papiers, die dennoch eintritt, läßt sich in Fixiersalzlösung vollständig entfernen. Nach dem Auswaschen des Fixiersalzes ist der Papieruntergrund wieder rein weiß, während die Silber-Flecke tiefschwarz hervortreten. In dieser Form lassen sich die Chromatogramme nach dem von Grassmann und Hannig<sup>10)</sup> angegebenen Verfahren photometrieren, wobei sich für die einzelnen Flecke symmetrische Schwärzungskurven mit gleich niederem Minimum und hohem Maximum ergeben. Bei sehr eng zusammenlaufenden Zuckern geht die Extinktion zwischen den Maxima natürlich nicht auf den 0-Wert zurück; die dem einzelnen Zucker entsprechende Schwärzungskurve läßt sich jedoch graphisch extrapolieren.

Anlage der Eichkurve

Die einem einzelnen Zucker entsprechende Fläche, die planimetrisch bestimmt wird, erwies sich in bestimmten Grenzen der aufgetragenen Zuckermenge proportional. Bild 1 zeigt die Schwärzungskurven und Tabelle 2 deren



Zucker	Glucose	Lactose	Lactotriose
50	13,4	6,5	3,2
25	7,5	3,4	1,8
12,5	4,2	2,2	1,1
6,25	2,5	1,1	0,7

4) K. Wallenfels, Naturwiss. 37, 491 [1950].  
5) K. Wallenfels, Ärztl. Forschg. 5, 1/430 [1951].  
6) S. M. Partridge, Nature [London] 164, 443 [1949].  
7) E. Chargaff, C. Levine u. Ch. Green, J. biol. Chemistry 175, 67 [1949].  
8)   
9)   
10)

ausgemessene Flächen für verschiedene auf dem Startpunkt des Chromatogramms aufgebrauchte Mengen von Glucose, Lactose und Lactotriose. Die Abhängigkeit zwischen 6,25 und 50  $\gamma$  Glucose verläuft geradlinig. Bei größeren Glucose-Mengen biegt die Kurve um, was einerseits darauf beruhen mag, daß mit der benützten photometrischen Anordnung zwischen Silberschichten verschiedener Dicke schlecht differenziert werden kann, andererseits auch darauf, daß bei großer Zuckerkonzentration im Fleck die aufgesprühte Menge Silbernitrat nicht für die quantitative Reaktion des Gesamtzuckers ausreicht. Bei zu großen Zuckerkonzentrationen im Fleck zeigt es sich häufig, daß in der Mitte eine Zone größerer Lichtdurchlässigkeit, d. h. geringeren Silber-Gehalts entsteht, die von einem Ring größeren Silber-Gehalts umgeben ist. Wir führen dies darauf zurück, daß an der Peripherie des Flecks noch Silbernitrat aus der Umgebung eindiffundiert, so daß in der Randzone gegebenenfalls mehr Silber gebildet werden kann als in der Mitte, wo an sich die höchste Zuckerkonzentration vorliegt. Die Schwärzungskurve hat dann eine Einsattelung. In diesem Falle muß ein neues Chromatogramm angesetzt werden, wobei die aufzutragende Menge so bemessen wird, daß die Fläche der Schwärzungskurve innerhalb der Grenzen der Geradlinigkeit liegt. Bei verschiedenen Monosacchariden muß jeweils eine besondere Eichkurve angelegt werden, weil die gebildete Silber-Menge verschieden sein kann. Glucose und Galaktose zeigten in unseren Versuchen weitgehende Übereinstimmung.

Disaccharide und Trisaccharide geben erwartungsgemäß geringere Silber-Mengen als Monosaccharide, so daß die Eichkurven Geradlinigkeit bis zu größeren aufgetragenen Zuckermengen ergeben.

### Trennung eines Gemisches aus Mono-, Di- und Trisacchariden

Die Zuckergemische, welche bei der enzymatischen Spaltung von Disacchariden entstehen, enthalten die durch Hydrolyse gebildeten Monosaccharide, den Rest des nicht gespaltenen Substrates und die durch Gruppenübertragung gebildeten Di-, Tri- und höheren Saccharide<sup>11, 12</sup>). Während einer Spaltung ändern sich die Mengen der einzelnen Komponenten und die quantitative Auswertung der in Zeitabständen dem Spaltansatz entnommenen Proben ergibt das wahre Bild der enzymatischen Reaktion<sup>13</sup>). Bild 2 zeigt die für eine Lactose-Spaltung ausgemessenen Schwär-

zungskurven und Tabelle 3 gibt die den Hauptkomponenten entspr. Flächenwerte für den Gesamtverlauf der Spaltung an.

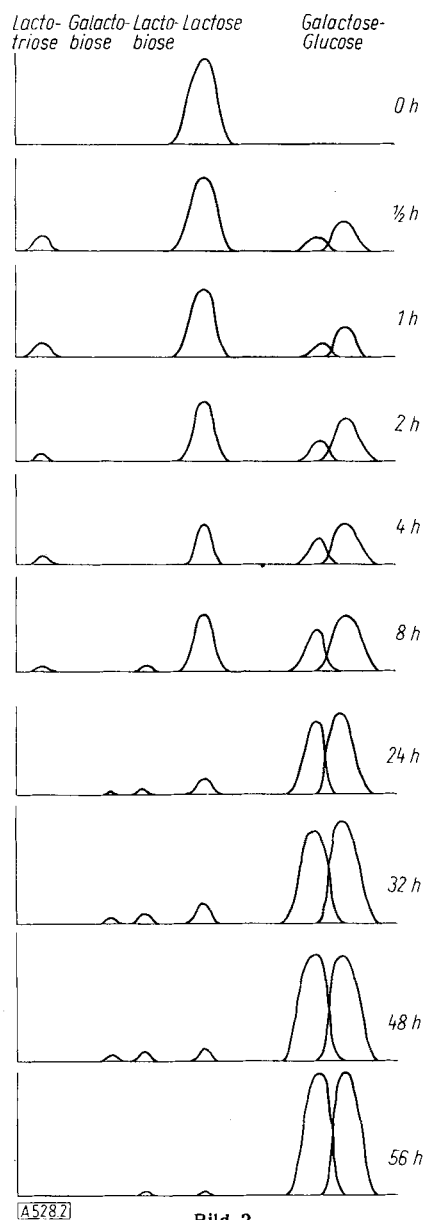


Bild 2  
Lactose-Hydrolyse mit Pilzlactase

Zucker \ Zeit	0	1/2	1	2	8	24	32	48	56h
Glucose . . . .	—	2,5	3,5	5,6	8,0	13,0	14,1	15,3	15,8
Galactose . . .	—	0,5	1,5	2,3	5,6	11,0	12,8	14,9	16,1
Lactose . . . .	33,0	27,0	24,5	18,7	16,0	4,1	3,3	1,9	0,3
Lactobiose . .	—	—	—	—	0,8	1,1	1,6	1,6	0,3
Galactobiose	—	—	—	—	—	0,3	1,1	1,1	—
Lactotriose . .	—	4,5	5,0	4,0	0,9	—	—	—	—
Summe der Flächenwerte	33,0	34,5	34,5	30,6	31,3	31,5	32,9	34,8	32,5

Tabelle 3  
Lactose-Spaltung mit Pilz-enzym

### Zuckerbestimmung durch kolorimetrische Formazan-Bestimmung

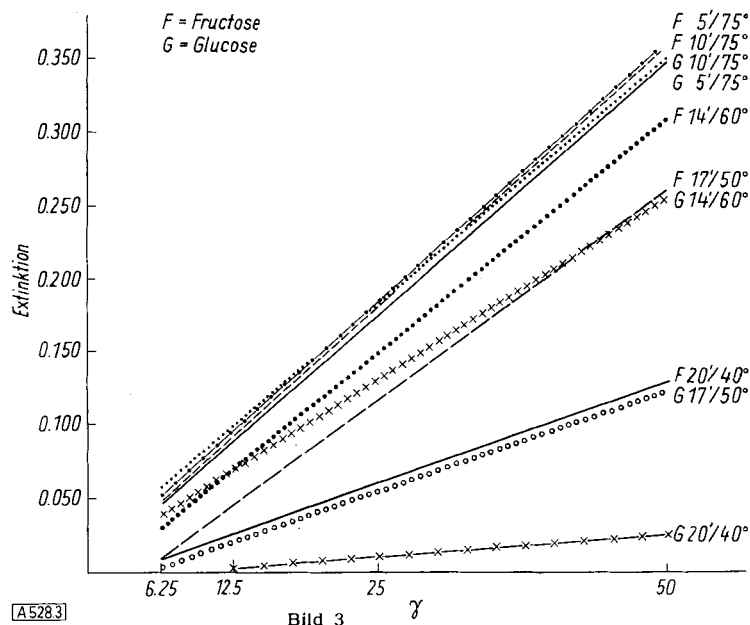
Der Hauptnachteil der geschilderten Methode besteht in dem relativ geringen Bereich, welches zwischen der minimalen und maximalen Zuckermenge liegt, für die eine geradlinige Abhängigkeit der gemessenen Fläche der Schwärzungskurve und der aufgetragenen Zuckermenge besteht. Einen wesentlich größeren Bereich konnten wir bei der Anwendung von Triphenyl-tetrazoliumchlorid (TTC) feststellen<sup>4</sup>). Bei diesem Verfahren bilden die reduzierenden Zucker den roten Formazan-Farbstoff. Die Empfindlichkeit der Reaktion steht bei Einhaltung der geeigneten Reaktionstemperatur der Silbernitrat-Reaktion nur wenig nach (Tab. 1). Als geeignetste Reaktionstemperatur hat sich 75 °C erwiesen. Die ersten quantitativen Versuche mit Glucose und Fructose nach dieser Methode<sup>4</sup>) hatten 40 °C als gut geeignet erwiesen. Bei 40 °C reagiert das Papier nicht oder nur sehr gering

<sup>11</sup>) K. Wallenfels, Naturwiss. 38, 306 [1951].

<sup>12</sup>) K. Wallenfels u. E. Bernt, diese Ztschr. 64, 28 [1952].

<sup>13</sup>) K. Wallenfels, E. Bernt u. G. Limberg, Liebigs Ann. Chem., im Druck.

mit der TTC-Lösung. Andere Zucker, z. B. Disaccharide, reagieren bei dieser Temperatur aber nur sehr schwach. Auch Monosaccharide zeigen erhebliche Unterschiede im Formazan-Bildungsvermögen. Z. B. entsteht aus Fructose etwa siebenmal mehr Formazan als aus Glucose<sup>14)</sup>, ein Faktor, den auch *Mattson* und *Jensen* fanden<sup>14)</sup>. Bei höheren Temperaturen steigt das Reaktionsvermögen der Glucose jedoch stark an. Bei 75 °C werden aus beiden Zuckern nahezu gleiche Formazan-Mengen gebildet. Die verschiedenen Zuckermengen entsprechenden Extinktionswerte bei steigender Reaktionstemperatur und Verkürzung der Reaktionszeiten sind Bild 3 zu entnehmen.



Wir arbeiten daher jetzt allgemein bei der zuerst von *O. Westphal* und Mitarbeitern<sup>15)</sup> bei der Anwendung der TTC-Methode auf die Analyse der Zuckerkomponente der Pyrogene besser geeignet befundenen Temperatur von 75 °C. Da hierbei der zuckerfreie Papieruntergrund schon erheblich mit TTC reagiert, was auf beginnender Hydrolyse der Cellulose durch die stark alkalische Reagenzlösung beruhen dürfte, ist es notwendig, den Blindwert des Papiers sorgfältig zu bestimmen. Der durch das Papier entstandene Fehler hängt natürlich von der Größe des Flecks ab, so daß die Papiermenge, die für die Auswertung eines Flecks aus dem Chromatogramm ausgeschnitten wird, in Rechnung gesetzt werden muß. Der Blindwert läßt sich aus Bild 4 entnehmen, welches die Abhängigkeit von der Papiermenge zeigt. Zur Bestimmung wird daher der einzelne ausgeschnittene Papierfleck gewogen, bevor das darin enthaltene Formazan extrahiert wird. Da auch bei

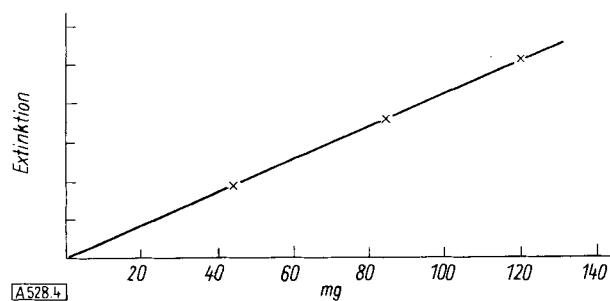
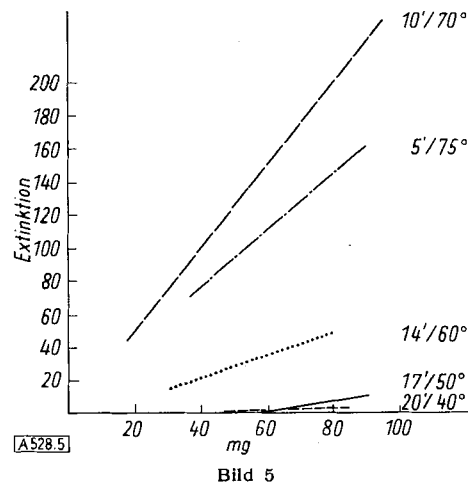


Bild 4  
Kurve für den Papierblindwert

<sup>14)</sup> A. M. Mattson u. C. O. Jensen, *Analytic Chem.* 22, 182 [1950].  
<sup>15)</sup> O. Westphal, *Z. Naturforsch.* 7b, 548 [1952].

sehr genauer Einhaltung der Arbeitsbedingungen die Blindwerte verschiedener Auswertungen keine völlige Übereinstimmung zeigen, legen wir von jedem auszuwertenden Chromatogramm unter Verwendung der keinen Zucker enthaltenden Papieranteile jeweils eine eigene Blindwertkurve an. Die Abhängigkeit des Blindwertes von der Reaktionstemperatur zeigt Bild 5.

Mit der TTC-Methode läßt sich um so genauer arbeiten, je besser man den Lichteinfluß auf das Papier und die eluierte Formazan-Lösung ausschließt. Einerseits wird aus der alkalischen TTC-Lösung und in dem mit der Lösung besprühten Papier im Licht Formazan gebildet,



andererseits nimmt eine Lösung von Formazan in Pyridin-HCl unter dem Einfluß des Lichtes an Farbintensität schnell ab. Besprüht man das Papier mit TTC-Reagenz im hellen Tageslicht, so erhält man wesentlich höhere Blindwerte und geringere Differenzen zwischen Zuckerwert und Blindwert. Über den Einfluß des Lichtes auf die Farbwerte während und nach der Extraktion der Formazan-haltigen Papierstücke unterrichtet Bild 6. Es zeigt,

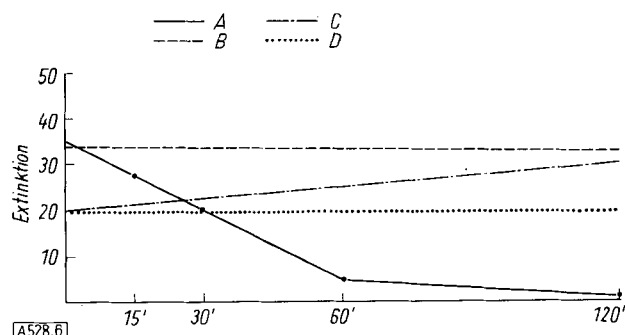


Bild 6

Lichtempfindlichkeit von Triphenylformazan und TTC  
A) Lösung von Triphenylformazan in Pyridin-HCl (9:1) in einer Küvette von 1 cm Schichtdicke im Freien (dünne Wolkendecke, keine direkte Sonnenbestrahlung) aufgestellt. — B) Dieselbe Lösung im Raum bei diffusum Licht. — C) Papierwerte eines schon entwickelten Chromatogramms von ein und derselben Größe im Raum bei diffusum Licht (einseitige Bestrahlung). — D) Papierwerte eines schon entwickelten Chromatogramms von derselben Größe beim Licht einer Glühbirne (100 W) im Abstand von zwei Metern (einseitige Bestrahlung) gemessen im Photometer Eppendorf bei 546 m $\mu$  und mit Küvetten mit 1 cm Schichtdicke

daß die Auswertung im diffusen Licht eines abgedunkelten Raumes zufriedenstellend möglich ist. Es ist empfehlenswert, die photometrische Auswertung innerhalb nicht zu langer Zeit vorzunehmen.

Als geeignetste Wellenlänge für die Photometrie hat sich die Quecksilberlinie 546 m $\mu$  bei 1 cm Schichtdicke

erwiesen. Bild 7 zeigt die für Mono-, Di- und Trisaccharide erhaltenen Eichkurven, welche Gradlinigkeit bei Konzentrationen zwischen 10 und 100 bzw. 10 und 200  $\gamma$  auf-

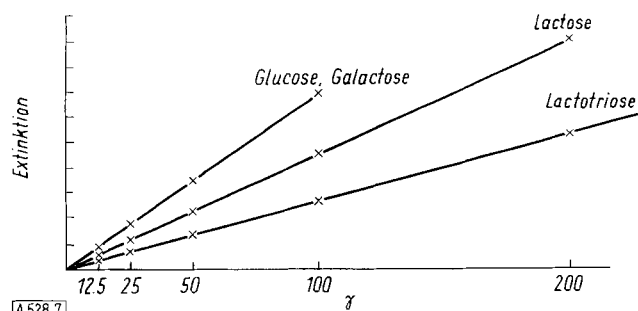


Bild 7  
Eichkurven für Mono-, Di- und Trisaccharide (TTC-Methode)

weisen. Tabelle 4 zeigt die mit der TTC-Methode ausgewerteten Mengen der einzelnen Komponenten des im Verlauf einer enzymatischen Hydrolyse von Lactose bzw.

Auswertung der Lactose-Spaltung mit Kälberdarm-Lactase							
Zucker	Zeit	0	15min	30min	1	2	4 8 h
Glucose	—	—	17	25	42	59	72
Galaktose	—	—	9	13	25	42	70
Lactobiose II	—	—	—	1	10	12	3
Lactose	150	123	113	72	34	10	5
Lactobiose I	—	—	—	—	—	—	2
Lactotriose	—	—	—	—	2	2	2
Summe ( $\gamma$ Zucker)	150	149	152	151	149	149	151

Auswertung der Maltose-Spaltung mit Pferdedarm-Lactase						
Zucker	Zeit	0	1	2	4	8 h
Glucose	—	—	10	15	27	41
Maltose	200	176	160	138	122	122
Maltotriose	—	—	7	13	27	27
Panose	—	—	5	7	10	11
Summe ( $\gamma$ Zucker)	200	198	195	202	201	201

Tabelle 4

Maltose vorliegenden Gemisches verschiedener Mono-, Di- und Trisaccharide. Die Übereinstimmung der Summen der einzelnen Zuckermengen über den ganzen Verlauf der Spaltung ist ein Beweis für die gute Brauchbarkeit der Methode.

#### Mikrobestimmung der Blutzucker mit der TTC-Methode

Bei der quantitativen Bestimmung des Blutzuckers wird häufig das Reduktionsvermögen benützt, so daß ein oft erheblicher Fehler durch andere reduzierende Bestandteile des Blutes bedingt ist. Enthält das Blut außer Glucose weitere reduzierende Zucker, z. B. Fructose, wie es bei therapeutischen oder diagnostischen Belastungen mit Laevulose der Fall ist<sup>16)</sup>, oder auch ohne Belastungen gelegentlich in höherem Maße vorkommt<sup>17)</sup>, so läßt sich mit den üblichen Reduktionsverfahren nur die Summe der Zucker ermitteln. Der Glucose-Wert wurde aus der Differenz zwischen der Fructose- und der Gesamtreduktion errechnet<sup>16)</sup>. Die sog. Restreduktion, d. h. der Reduktionswert der bei der üblichen Methode nach Hagedorn-Jensen miterfaßten Stoffe, welche nicht Glucose sind, wird zwischen 10 und 25 mg% angegeben<sup>18, 19, 20)</sup>. Da sich Glucose durch ihren  $R_F$ -Wert im Chromatogramm charakteristisch sowohl von

<sup>16)</sup> K. Stuhlfauth, *Ärzt. Forsch.* 5, 1/414 [1951].

<sup>17)</sup> K. Wallenfels, *Naturwiss.* 38, 238 [1951].

<sup>18)</sup> A. Kosterlitz, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch.* 173, 159 [1933].

<sup>19)</sup> H. Frank u. E. Kirberger, *Biochem. Z.* 320, 359 [1950]. *Klin. Wschr.* 29, 15, 297 [1951].

<sup>20)</sup> M. Takata u. Y. Takahashi, *Klin. Wschr.*, im Druck.

den anderen möglicherweise vorkommenden Blutzuckern als auch von anderen reduzierenden Stoffen unterscheidet, sollte es möglich sein, die quantitative Auswertung des Chromatogramms der Blutzucker für eine Bestimmung der „wahren Glucose“ und evtl. anderer im Blut vorkommender Zucker zu benützen. Die TTC-Methode wurde von uns benützt und erwies sich als genügend empfindlich, um die quantitative Bestimmung der Zucker in 0,1 ml Blut auszuführen. Zur Erzielung gut getrennter runder Zuckerflecke ist es erforderlich, die Blutprobe zu enteiweißen und zu entsalzen. Zur Enteiweißung benützten wir ein Gemisch aus Alkohol und Chloroform (4:1), zur Entsalzung die Ionenaustauscher Amberlit IR 120 und IR 4b im Gemisch. Die normalerweise in 0,1 ml Blut enthaltene Glucose-Menge reicht aus, um drei parallele chromatographische Bestimmungen auszuführen, von welchen der Mittelwert genommen wird. Bei Auftragen verschiedener aliquoter Mengen wurden untereinander gut übereinstimmende Blutglucosewerte gemessen. (Tabelle 5). Bei zwei Bestimmungen wurden der Probe 20  $\gamma$  Fructose zugesetzt, welche sich

Zucker	aufgetragene mm <sup>3</sup>	Extinktion	gef. Zuckermenge	mg %
Glucose	50	0,237	34 $\gamma$	68,0
Glucose	45	0,217	31	68,8
Glucose	30	0,152	21	70,0
Glucose	25	0,126	17	68,0
Fructose*)	30	0,146	20	—
Fructose*)	25	0,147	20	—
Gesamtreduktion nach Hagedorn-Jensen				80,0

\*) 20  $\gamma$  Fructose zugesetzt.

Tabelle 5  
Blutzuckerbestimmung

in dem mit Butanol-Essigsäure entwickelten Chromatogramm gut von der Glucose trennte und quantitativ wieder gefunden wurde.

Die gleiche Blutprobe zeigte einen Hagedorn-Jensen-Wert von 80 mg%. Die „wahre Glucose“ war also in diesem Fall um 10–12 mg% niedriger als die Gesamtreduktion, ein Wert, der mit dem von Takata<sup>20)</sup> mittels seiner neuen Perjodat-Methode gefundenen in guter Übereinstimmung steht.

#### Versuchsteil

##### Chromatographie

Die zu analysierenden Zuckerlösungen werden in Mengen von 5 mm<sup>3</sup> auf den Startpunkt des Chromatogramms wie üblich aufgetragen. Die beste Auswertungsmöglichkeit besteht, wenn die Menge so bemessen wird, daß von Monosacchariden jeweils etwa 10–25  $\gamma$ , von Disacchariden 10–50  $\gamma$  und von Trisacchariden 10–100  $\gamma$  enthalten sind. Es wurde absteigend chromatographiert und als Lösungsmittelgemisch n-Butanol-Pyridin-Wasser (6:4:3) benützt. Die Laufzeit betrug 16–20 h, wobei die Glucose eine Strecke von ca. 25 cm bei Butanol-Pyridin-Wasser und von 20 cm bei Butanol-Essigsäure-Wasser zurückgelegt hatte.

##### Sichtbarmachen der Zuckerflecken

a) Silbernitrat-Ammoniak: Das Chromatogramm wird mit Wäscheklammern an zwei Glasstäben befestigt, vertikal aufgehängt und mit einer frisch hergestellten ammoniakalischen Silbernitrat-Lösung (0,2n AgNO<sub>3</sub>—5n NH<sub>3</sub>, 1:1, v:v) auf beiden Seiten besprüht. Für ein Blatt von der Größe 45×54 cm werden etwa 20–30 ml Silbernitrat-Lösung benötigt. Anschließend wird im Trockenschrank im Luftstrom 6 min bei 80 °C getrocknet. Die Zucker treten als schwach braune Flecke hervor, während das Papier kaum merkbar gebräunt ist. Nun wird das Chromatogramm, oben und unten mit Glasstäben versehen, in einen mit strömendem Wasserdampf von 100 °C gefüllten Kasten durch einen 5 cm breiten Schlitz gesenkt. Die Zucker reagieren sofort. Die Reaktion ist bei Monosacchariden schon nach 10 sec quantitativ, bei höheren Sacchariden scheint sie nach 15–20 sec beendet zu sein. Die Flecke sind dunkelbraun, während das Papier schwach hellbraun ist. Anschließend wird sogleich mit 10proz. Thiosulfat-Lösung fixiert und das Thiosulfat durch Einlegen der

Chromatogramme in fließendes Wasser während 3–4 h ausgewaschen. Sie werden nun auf Filterpapier abgepreßt und im Trockenschrank getrocknet. Die Flecke sind je nach Zuckermenge schwarzgrau bis schwarz, während das Papier nahezu farblos ist. Wenn sorgfältig gewässert wurde, d. h. alle Thiosulfat-Reste entfernt sind, sind die Chromatogramme unbegrenzt haltbar.

b) TTC: Unter Vermeidung von direkter Sonnenbestrahlung, möglichst in einem abgedunkelten Raum, werden die Papierbogen mit einer alkalischen Lösung von Triphenyl-tetrazoliumchlorid (2% TTC in Wasser, 1n NaOH, 1:1, v: v) wiederum beidseitig besprüht. Für ein Blatt von 42×50 cm wurden 38 ml TTC-Lösung verbraucht. Anschließend wird in den Dampfkasten eingehängt, in welchem durch Thermoregulation des im Wasser befindlichen Heizkörpers eine mit Wasserdampf gesättigte Atmosphäre von 75 °C erzeugt wird. In den zuckerhaltigen Flecken wird das TTC zum leuchtend roten Formazan reduziert, während das Papier in dieser Zeit sich nur schwach rot anfärbt. Es wird anschließend in warmer Luft von nicht mehr als 40 °C getrocknet. Bei allen Operationen ist jede starke oder länger dauernde Lichteinwirkung auf das Chromatogramm zu vermeiden.

### Quantitative Auswertung

a) Das Chromatogramm wird in 5 cm breite Streifen geschnitten und nach dem Einlegen in die Transparenzlösung nach *Grassmann* und *Hannig* direkt photometriert. Die Extinktionen werden von Millimeter zu Millimeter abgelesen, auf Millimeterpapier aufgetragen und mit dem Planimeter ausgemessen. Bei gut ausgeführter Chromatographie ergeben sich symmetrische Glockenkurven. Um gute Proportionalität zwischen Zuckerkonzentration und Fläche zu erhalten, ist es besonders wichtig, daß das Chromatogramm so ausgeführt wird, daß die Silber-Flecke möglichst gleichmäßig rund sind und nicht an der der Startlinie zugewandten Seite Einbuchtungen aufweisen. Man erreicht dies durch vorherige sorgfältige Entsalzung der zu analysierenden Lösungen. Sie läßt sich durch Behandlung mit Ionenaustauschern (z. B. Amberlit IR 120 und IR 4B) erzielen. Zur Anlage der Eichkurven wurden Monosaccharide in steigenden Konzentrationen von 2–25, Disaccharide von 5–15 und Trisaccharide von 10–100 γ auf den Startpunkt aufgesetzt.

b) TTC-Methode: Aus dem getrockneten Chromatogramm werden zur Bestimmung des Blindwertes aus dem zuckerfreien Teil drei etwa den Formazan-Flecken entsprechende Papierstücke steigender Größe ausgeschnitten und mit der Analysenwaage gewogen, wobei wiederum der Raum abgedunkelt sein soll. Die den Zuckern entsprechenden Farbflecke werden ebenfalls ausgeschnitten und gewogen. Jedes Papierstück wird nun an den

Boden eines Reagenzglases gebracht und  $\frac{1}{2}$  h mit 5 ml eines Gemisches von Pyridin und konz. Salzsäure (9:1, v: v) extrahiert, wobei man öfters umschüttelt. Nach dem Abgießen wird wiederum mit 5 ml frischen Lösungsmittels, dann nochmals mit derselben Menge extrahiert. Die vereinigten Lösungen werden auf 15 ml aufgefüllt und mit der Quecksilberlinie 546 mμ im Photometer Eppendorf kolorimetriert. Der dem Gewicht jedes Fleckes entsprechende Papierblindwert wird aus der Eichkurve der Blindwertbestimmungen entnommen und die Blindwertextinktion von den bei den Zuckerflecken gemessenen Extinktionen subtrahiert. Für die Eichkurven werden Mengen von 5–100 γ bei Monosacchariden, 10–200 γ bei Disacchariden und 13–300 γ bei Trisacchariden aufgetragen. Parallele Bestimmungen ergeben eine mittlere Schwankung von etwa 4%.

### Quantitative Blutzuckerbestimmung mit TTC

0,1 ml Blut werden mit einer graduierten Blutzuckerpipette von 0,1 ml Inhalt zur Enteiweißung in einem Mikroreagenzglas von 1 cm Durchmesser und 4 cm Höhe zu 0,75 ml einer Alkohol-Chloroform-Mischung (4:1) gegeben. Das ausgefallene Eiweiß wird mit einem zu einer langen Spitze ausgezogenen Glasstäbchen gut zerkleinert und verrührt, sodann wird abzentrifugiert und noch 3 mal mit je 0,75 ml 90proz. Alkohol gewaschen.

Die Lösungen werden in einem kleinen Tablettengläschen (1,5 cm Durchmesser und 3,5 cm Höhe) mit flachem Boden, mit 0,5 ml eines Amberlitgemisches aus IR 4B und IR 120 (1:1) versetzt und bleiben ca.  $\frac{1}{2}$  h unter öfterem Umrühren stehen. Sodann wird die Lösung vorsichtig, ohne den Amberlit aufzuwirbeln, in ein kleines Kristallisierschälchen (unterer Durchmesser 2 cm, oberer Durchmesser 4 cm, Höhe 2 cm) abgegossen. Der Amberlit wird anschließend 3 mal mit je 0,75 ml 90proz. Alkohol gewaschen und die Lösungen vereinigt. Diese bringt man nun im Vakuumexsiccator über Blaugel zur Trockene. Es ist zweckmäßig, nicht zu hohes Vakuum anzuwenden, da die Lösung sonst leicht verspritzt. Bei 50 mm Hg-Säule ist die Trocknung in ca. 3–4 h beendet. Der Rückstand wird mit 0,1 ml dest. Wasser durch Verrühren mit einem spitzen Glasstäbchen quantitativ aufgenommen. Er löst sich nicht klar, was aber die Bestimmung nicht beeinflusst. Man saugt nun 3 mal genau je 25 mm<sup>3</sup> mit drei Blutzuckerpipetten auf und bringt diese Menge durch 2–3 maliges Auftragen quantitativ auf drei Startpunkte eines Chromatogramms. Dieses wird 36 h der chromatographischen Verteilung in n-Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:5) unterworfen. Nach dieser Zeit wird das Blatt 30 min bei 80–90 °C getrocknet und nach der TTC-Methode ausgewertet.

Eingeg. am 17. August 1953 [A 528]

## Wahl der Lösungsmittel für die Verteilung zwischen zwei flüssigen Phasen\*)

Von Dipl.-Chem. F. A. v. METZSCH, Organisch-chemisches Institut der Universität Göttingen

Es werden die Anforderungen an Lösungsmittelgemische für die fraktionierte Verteilung zusammengestellt. In einer Tabelle werden etwa 400 begrenzt mischbare Paare wasserfreier organischer Lösungsmittel aufgeführt. In einer zweiten Tabelle wird eine Übersicht über 360 bereits in der Literatur beschriebene Systeme für Trennungen von organischen und anorganischen Stoffgemischen gegeben.

Bei Anwendung der fraktionierten Verteilung zur Trennung von Stoffgemischen gibt es im wesentlichen zwei Möglichkeiten zur Verbesserung des Trenneffektes:

- 1.) Vermehrung der Stufenzahl, über die der Verteilungsvorgang geführt wird,
- 2.) Auffindung eines selektiven Lösungsmittels bzw. eines Lösungsmittelpaares von hoher Trennwirkung.

Die Grundlagen der diskontinuierlichen multiplikativen Verteilung zwischen zwei flüssigen Phasen\*\*) wurden

bereits ab 1944 von *Craig* und Mitarbb.<sup>1, 2)</sup> behandelt und von *Rauen*<sup>3)</sup> sowie von *Hecker*<sup>4)</sup> weiter ausgeführt. Der Forderung nach einer möglichst hohen Stufenzahl wurde sowohl bei Laboratoriumsapparaturen<sup>5–7)</sup> als auch bei halotechnischen<sup>8–10)</sup> und technischen Apparaten<sup>11)</sup> Rechnung

<sup>1)</sup> L. C. Craig, J. biol. Chemistry 155, 519 [1944].

<sup>2)</sup> B. Williamson u. L. C. Craig, J. biol. Chemistry 168, 687 [1947].  
L. C. Craig u. O. W. Post, Analytic. Chem. 21, 500 [1949]; s. a. Fortschr. Chem. Forsch. 1, 320 [1949].

<sup>3)</sup> M. Rauen u. W. Stamm, Chem.-Ing.-Techn. 21, 259 [1949].

<sup>4)</sup> E. Hecker, Z. Naturforsch. 8b, 77 [1953].

<sup>5)</sup> N. Grubhofer, Chem.-Ing.-Techn. 22, 209 [1950].

<sup>6)</sup> L. C. Craig, Analytic. Chem. 22, 1346 [1950]. L. C. Craig, W. Hausmann, E. H. Ahrens u. E. Harfenist, Analytic. Chem. 23, 1236 [1951].

<sup>7)</sup> F. A. v. Metzsch, Chem.-Ing.-Techn. 25, 66 [1953].

<sup>8)</sup> I. D. A. Johnson u. A. Talbot sowie M. W. Kies u. P. L. Davis, ref. in Chem.-Ing.-Techn. 23, 524 [1951].

<sup>9)</sup> W. Fischer u. O. Jüßermann, Chem.-Ing.-Techn. 23, 298 [1951].

<sup>10)</sup> E. G. Scheibel u. A. E. Karr, Ind. Engng. Chem. 42, 1048 [1950] sowie R. Rometsch, Helv. chim. Acta 33, 185 [1950].

<sup>11)</sup> H. Eisenlohr, Chem.-Ing.-Techn. 23, 12 [1951].

\*) Demnächst erscheint im Verlag Chemie:

E. Hecker, Gegenstromverteilung, worin besonders auch auf die Probleme der Lösungsmittelwahl eingegangen wird. Vorbestellungen an Verlag Chemie, GmbH., Weinheim/Bergstr.

\*\*) Zur Nomenklatur der Verteilungsverfahren vgl. H. Hecker u. K. Allemann, diese Ztschr. im Druck.