

B. Jambor

**Tetrazoliumsalze
in der Biologie**



VEB GUSTAV FISCHER VERLAG JENA

Tetrazoliumsalze in der Biologie

Von

Dr. - Techn. Béla Jámbor

~~Chemie-Technik~~

Doktor der ~~Biologischen~~ Wissenschaften

Dozent der Pflanzenbiochemie

an der L. Eötvös Univefsität Budapest

Mit 101 Abbildungen im Text



VEB GUSTAV FISCHER VERLAG JENA

1960

Vorwort

Der Verfasser wollte die Grundlagen des sinngemäßen Gebrauches der sich in den mannigfaltigsten Forschungszweigen immer mehr verbreitenden Tetrazoliumsalze auf Grund eigener Untersuchungen und der Literatur zusammenfassen. Die vielseitigen Zusammenhänge und Beziehungen der Frage (Organische Chemie, Photochemie, Polarographie, Enzymologie usw.) sowie die hochgradige Dispersität der betreffenden Literatur verursachen große Schwierigkeiten. Diese begründen es zum Teil, daß die vorliegende erste Arbeit dieser Richtung weit davon entfernt ist, vollständig zu sein und allen Anforderungen zu genügen. Deshalb empfängt der Verfasser jede kritische Bemerkung seitens der Fachgenossen mit verbindlichstem Dank, um eine etwaige weitere Auflage besser gestalten zu können. Die auf diesem Arbeitsfeld tätigen Fachkollegen werden daher gebeten, Sonderdrucke ihrer Arbeiten dem Verfasser ohne besondere Bitte zuzusenden zu wollen. Nur so kann die Literatur mit wenig Arbeitsaufwand fortlaufend aktuell gehalten werden.

Die Aufgabe einer etwaigen nächsten Auflage wäre auch eine Ergänzung durch ein die Ergebnisse der praktischen Anwendung zusammenfassendes histochemisches Kapitel.

Der Verfasser ist verbindlichsten Dank schuldig den Herren Prof. Dr. F. B. STRAUB, S. MÜLLER, B. GYÖRFFY und K. VAS für wertvolle Kritik, Herrn Prof. Dr. H. KNÖLL für seine Unterstützung beim Erscheinen des Buches sowie den Herren G. LÖBER und H. WAGNER für die Hilfe beim Verlegen. Besonders bin ich den Fachkollegen aus aller Welt für die freundliche Zusendung ihrer Sonderdrucke dankbar, des weiteren dem Verlag und der Druckerei für die sorgfältige Arbeit.

Budapest, 16. Juni 1959.

Doz. Dr. B. JÁMBOR

Pflanzenphysiol. Inst. der Universität,
Muzeum-körut 4/a, Budapest.

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Vorwort | V |
| Abkürzungsverzeichnis | XI |
| I. Einleitung | 1 |
| Literatur | 3 |
| II. Organische Chemie | 4 |
| A. Einleitung | 4 |
| B. Synthese der Formazane | 4 |
| 1. Diazoniumsalze und Aldehyd-Phenylhydrazone | 5 |
| 2. Phenylhydrazin und Säure-Phenylhydrazide | 5 |
| 3. Phenylhydrazid-Chlorid und Phenylhydrazon | 5 |
| C. Synthese der Tetrazoliumverbindungen | 5 |
| D. Eigenschaften der Formazane und Tetrazoliumverbindungen | 6 |
| E. Anwendung der chemischen Reduktion der Tetrazoliumsalze | 7 |
| Literatur | 10 |
| III. Elektrochemie | 11 |
| A. Redoxpotential | 11 |
| B. Die polarographische Untersuchung von TTC | 14 |
| 1. Zahl der polarographischen Stufen und die Elektronenzahl | 14 |
| 2. Die pH-Abhängigkeit der Halbstufenpotentiale | 16 |
| 3. Charakter der einzelnen Stufen | 19 |
| a) Abhängigkeit der Stufenhöhe von der TTC-Konzentration | 19 |
| b) Abhängigkeit der Stufenhöhe vom Quecksilberniveau | 19 |
| c) Anomale Stufen bei hoher TTC-Konzentration | 22 |
| d) Ablauf der Reduktion | 25 |
| e) Die Frage der Reversibilität | 34 |
| C. Polarographische Untersuchung von Ditetrazoliumsalzen | 41 |
| 1. Einfluß des pH-Wertes | 42 |
| 2. Feststellung der Elektronenzahl | 44 |
| 3. Untersuchung der Adsorptionsstufe | 45 |
| 4. Die pH-Abhängigkeit des Reduktionspotentials | 47 |
| 5. Eine besondere Erscheinung | 48 |
| 6. Polarographische Untersuchung von „Tetrazolpurpur“ ⁴² | 49 |
| 7. Untersuchung des ST | 50 |
| D. Polarographische Untersuchung anderer Tetrazoliumverbindungen | 51 |
| E. Oszillographische Untersuchungen | 56 |
| Literatur | 58 |

| | |
|---|-----|
| IV. Photochemie | 59 |
| A. Die Disproportionierungsreaktion | 61 |
| 1. Quantitative Verhältnisse der Reaktion | 62 |
| 2. Kinetik der Reaktion | 63 |
| 3. Einfluß der TTC-Konzentration auf die Reaktionsgeschwindigkeit | 64 |
| 4. Einfluß des pH-Wertes auf die Reaktion | 65 |
| 5. Einfluß der Temperatur | 66 |
| 6. Die Disproportionierungsreaktion in starker Lauge im Dunkeln | 67 |
| 7. Das Verhalten von anderen Tetrazoliumverbindungen | 68 |
| B. Photooxydation der Formazane | 69 |
| 1. Zeitlicher Ablauf der Reaktion | 70 |
| 2. Die Autokatalyse | 70 |
| 3. Wirkung von Elektrolyten | 72 |
| 4. Einfluß des Lösungsmittels | 73 |
| 5. Einfluß des pH-Wertes | 73 |
| 6. Einfluß der Konzentration | 75 |
| 7. Entstehung von Wasserstoffperoxyd | 75 |
| 8. Die Reaktion in Stickstoffatmosphäre | 78 |
| 9. Oxydation des Formazans in alkalischer Lösung im Dunkeln | 79 |
| C. Cis-trans-Umlagerung des Formazans | 80 |
| D. Katalytische Wirkung des Lichtes auf die Reduktion der Tetrazoliumsalze | 81 |
| 1. Ausmaß der Reduktion im Licht und im Dunkeln | 82 |
| 2. Charakter der katalytischen Wirkung | 83 |
| 3. Methode zum getrennten Nachweis der Dehydrogenase auf der Oberfläche und im Inneren der Zelle | 85 |
| 4. Wirkung von Kristallisationskeimen | 86 |
| Literatur | 87 |
| V. Enzymologie | 89 |
| A. Mechanismus der enzymatischen Reduktion | 89 |
| B. Maß der Reduktion | 94 |
| C. Nachweis der Vitalität | 96 |
| D. Einfluß der Hemmstoffe | 101 |
| E. Toxizität | 111 |
| F. Eindringen der Tetrazoliumsalze in die Zelle | 116 |
| G. Bedeutung der intakten Zellenstruktur | 121 |
| H. Aktivitätsmessung von Dehydrogenasen | 128 |
| 1. Messung des Substratverbrauches | 128 |
| 2. Die WARBURG-Technik | 129 |
| 3. Die THUNBERG-Technik | 129 |
| 4. In der Literatur beschriebene Tetrazolium-Aktivitätsmeßmethoden | 130 |
| 5. Die Methode von JÁMBOR und DÉVAY | 135 |

| | |
|---|-----|
| a) Die Inkubationszeit | 136 |
| b) Die bakterielle Infektion | 138 |
| c) Einfluß der TTC-Konzentration | 139 |
| d) Gleichzeitige Wirkung von verschiedenen Substraten | 141 |
| e) Einfluß der Einwaage | 142 |
| Literatur | 144 |
| VI. Nachtrag | 147 |
| Literatur | 151 |
| Register | 152 |

I. EINLEITUNG

Das Triphenyltetrazoliumchlorid wurde von PECHMANN und RUNGE [7] im Jahre 1894 erstmalig hergestellt. Sie bewiesen die Struktur der Verbindung und charakterisierten ihre Eigenschaften. Lange Zeit, beinahe ein halbes Jahrhundert, wurden diese Verbindung sowie die inzwischen hergestellten Abkömmlinge nur aus organisch-chemischen Gründen und Interessen hergestellt und studiert. Sie wurden aber praktisch nicht verwendet.

Im Jahre 1941 haben KUHN und JERCHEL [1] mit Invertseifen gearbeitet und im Zusammenhang damit bakteriostatisch wirkende Substanzen gesucht. Dabei wurden die lange vergessenen Tetrazoliumverbindungen wieder hervorgeholt. Während ihrer Untersuchungen [2] haben sie feststellen können, daß diese Substanzen unter dem Einfluß von verschiedenen biologischen Materialien (Backhefe, pflanzliche Stoffe usw.) zu den roten, wasserunlöslichen Formazanen reduziert werden. Schon damals haben sie ihre Meinung zum Ausdruck gebracht, daß sich die Reduktion der Tetrazoliumverbindungen mit Hilfe von Enzymen abspielt und haben deshalb ein weites biologisches Anwendungsfeld vorhergesehen.

Auf Grund der Arbeit von KUHN und JERCHEL [2] hat LAKON [3, 4] eine Methode ausgearbeitet, um die Keimfähigkeit von verschiedenen Samen mit Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) zu bestimmen. Während des Krieges sind diese Arbeiten, die mit der biologischen Anwendung der Tetrazoliumverbindungen zusammenhängen, nur in Deutschland bekannt geworden. Nach dem Kriege aber lernte DUTCHER während einer Auslandsreise diese Methode kennen und hat sie dann gemeinsam mit MATTSON und JENSEN [5] in der großen Öffentlichkeit propagiert. Von nun an verbreitete sich die Anwendung der Tetrazoliumverbindungen sowohl für biologische Untersuchungen als auch für Routinearbeiten und Forschungszwecke in außerordentlichem Maße, und heute besteht die Literatur, die sich damit befaßt, aus mehreren hundert Abhandlungen.

Ihre große Verbreitung verdanken die Tetrazoliumverbindungen gegenüber den bis heute für ähnliche Zwecke verwendeten Redoxindikatoren folgenden vorzüglichen Eigenschaften:

1. Während die allgemein bekannten Redoxindikatoren, z. B. Methylenblau, im allgemeinen in der oxydierten Form farbig und in der reduzierten Form farblos sind, ist die oxydierte Form des TTC farblos und die reduzierte farbig. Da die Redoxindikatoren in der Biologie im allgemeinen wegen ihrer Reduzierbarkeit verwendet werden, d. h. für Messungen der Reduktionsfähigkeit, ist es klar, daß die Änderung viel besser wahrnehmbar ist, wenn sie aus dem farblosen in den farbigen Zustand erfolgt.

2. Gegenüber den anderen Redoxindikatoren ist die reduzierte Form der Tetrazoliumverbindungen (Formazane) im allgemeinen wasserunlöslich. Das hat wieder zwei Vorteile:
 - a) Die reduzierte Form bleibt an Ort und Stelle der Reduktion, so daß die topographische Verteilung der reduzierenden Enzyme im Gewebe bzw. in der Zelle bestimmt werden kann.
 - b) Wegen der Unlöslichkeit der reduzierten Form ist diese gegenüber dem Luft-sauerstoff nicht so empfindlich wie z. B. das Leuko-Methylenblau, und man braucht beim Arbeiten mit TTC nicht unbedingt anaerobe Bedingungen einzuhalten. Das erleichtert die Arbeit wesentlich.
3. In derselben Richtung wirkt auch der Umstand, daß die Bildung der meisten Formazane ein irreversibler Prozeß ist. Die Reduktion der Tetrazoliumverbindungen geht ganz leicht vor sich, dagegen kann die Oxydation der Formazane nur unter dem Einfluß von starken Oxydationsmitteln erfolgen.
4. Für die biologische Verwendung ist es ferner wichtig, daß die Toxizität der Tetrazoliumverbindungen gleich oder geringer ist als die der anderen Redoxindikatoren, so daß die Tetrazoliumverbindungen auch „in vivo“ anwendbar sind.

Wegen der obengenannten Vorteile wurde eine umfangreiche Forschung begonnen, um einerseits verschiedene Tetrazoliumverbindungen herzustellen und andererseits deren verschiedene Verwendungsmethoden auszuarbeiten. Heute verfügen wir schon über mehrere hundert Arbeiten, die über einige hundert hergestellte Tetrazoliumverbindungen berichten, von denen aber für biologische Zwecke nur einige Verwendung fanden. Was die Verwendungsmöglichkeiten betrifft, können diese in folgende Gruppen eingeteilt werden:

1. Messung von Dehydrogenasenaktivität in Analogie zur THUNBERG'schen Methode sowohl im intakten Gewebe als auch in Homogenaten und Zellsuspensionen.
2. Nachweis von Dehydrogenasen in histochemischen Präparaten nach einer „in vitro“-Inkubation.
3. Nachweis von Dehydrogenasen in postvital hergestellten Schnitten nach einer „in vivo“-Einspritzung von Tetrazoliumverbindungen.
4. Nachweis von nicht enzymatisch reduzierenden Stoffen bzw. deren Bestimmung (reduzierende Zucker, Vitamin C).

Die Literatur über die Chemie und die biologische Verwendung der Tetrazoliumverbindungen umfaßt heute schon mehrere hundert Arbeiten. Darüber hinaus sind auch einige Reviews erschienen [6, 8, 9, 10, 11].

Nach Übersicht der umfangreichen Literatur kann behauptet werden, daß die oben erwähnten Verwendungsmethoden im allgemeinen auf empirischer Basis ausgearbeitet wurden ohne Erkenntnis der Reaktionsmechanismen. In den meisten Fällen wurden nicht einmal sehr kritische Untersuchungen durchgeführt. Das hatte dann zur Folge, daß die mit den Tetrazoliumverbindungen erhaltenen biologischen Ergebnisse sehr oft nicht reproduzierbar und miteinander nicht vergleichbar waren. Es schien deshalb notwendig, den Reaktionsmechanismus der Reduktion der Tetrazoliumverbindungen, speziell bei dem weitverbreiteten TTC, die photochemischen Reaktionen und andere Vorbedingungen der enzymologischen Anwendbarkeit sowie deren Grenzen eingehend zu studieren.

Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit kann in folgenden Fragengruppen zusammengefaßt werden:

1. Mechanismus der Reduktion von TTC und anderen Tetrazoliumverbindungen.
2. Die Reduktionspotentialwerte und deren Abhängigkeit vom pH-Wert des Mediums.
3. Die Frage der Reversibilität des Redoxvorganges und der Aktivierungsenergie, die damit verbunden ist.
4. Mechanismus der Lichtreaktionen der Tetrazoliumverbindungen und daraus sich ergebende Schlußfolgerungen auf die Natur dieser Verbindungen.
5. Feststellung der Frage, ob das Licht die chemische und enzymatische Reduktion der Tetrazoliumverbindungen katalysiert.
6. Im Zusammenhang mit der biologischen Verwendung wäre die Untersuchung folgender Faktoren wichtig:
 - a) Einwirkung der Konzentration von Substrat, biologischem Objekt und TTC auf das Ausmaß der Reduktion.
 - b) Einwirkung der Zerstörung der Zellenstruktur (Homogenisierung), der Anwesenheit von Luftsauerstoff und der Vakuum-Infiltration auf die Formazanbildung.
 - c) Eindringen von TTC in das intakte Gewebe und die intakten Zellen.
 - d) Untersuchung der Möglichkeit, verschiedene Dehydrogenasen nebeneinander zu bestimmen.

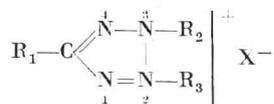
Literatur I

- [1] KUHN, R., und JERCHEL, D., Ber. dtsh. Chem. Ges. 74 B., 941 (1941).
- [2] — — Ber. dtsh. Chem. Ges. 74 B., 949 (1941).
- [3] LAKON, G., Ber. dtsh. Bot. Ges. 60, 434 (1942).
- [4] — Saatgut-Wirtschaft, 180 und 205 (1953).
- [5] MATTSON, A. M., JENSEN, C. O., und DUTCHER, R. A., Science 106, 294 (1947).
- [6] NINEHAM, A. W., Chem. Rev. 55, 355 (1955).
- [7] PECHMANN, H., und RUNGE, P., Ber. dtsh. Chem. Ges. 27, 2920 (1894).
- [8] RAGGIO, M., und DE RAGGIO, N. M., Cienciae invest. 7, 35 (1951).
- [9] RIED, W., Angew. Chem. 64, 391 (1952).
- [10] SMITH, F. E., Science 113, 751 (1951).
- [11] SONCIN, E., Arch. Ital. Sci. Farmacol. Ser. III. 4, 3 (1954).

II. ORGANISCHE CHEMIE

A. Einleitung

Die Struktur der Tetrazoliumsalze kann folgendermaßen dargestellt werden:



Der zentrale Tetrazoliumring enthält ein Kohlenstoffatom und vier Stickstoffatome. Eines der Stickstoffatome ist quarternär und demzufolge haben die Tetrazoliumverbindungen Salzcharakter. Anstelle von R_1 können Alkyl-, Aryl- und sogar heterozyklische Substituenten stehen. Die Gruppen R_2 und R_3 sind aber bei allen bis jetzt hergestellten Tetrazoliumverbindungen Aryl-Gruppen.

Die aus Tetrazoliumverbindungen durch Reduktion entstehenden Formazane kommen durch Aufnahme von zwei Elektronen und einem Proton zustande. Diese Aufnahme vollzieht sich an den Stickstoffatomen 2 und 3, deren Bindung und damit gleichzeitig auch der Fünfring aufgespalten wird:



Die aufgezeichnete Strukturformel enthält also ein Proton mehr als die vorherige. Ein weiteres Proton dient zur elektrostatischen Neutralisierung des zum Tetrazoliumkation gehörenden Anions (z. B. Cl^-). Das Formazan ist demnach kein Kation, sondern ein neutrales Molekül.

Eine sehr große Zahl von Formazanen und Tetrazoliumverbindungen wurden bisher hergestellt. Die verschiedenen Synthesemethoden, die Strukturfragen der Verbindungen sowie deren Eigenschaften wurden von RIED [13] kurz zusammengefaßt, von NIENEHAM [8] dagegen in einer 130 Seiten umfassenden Monographie beschrieben. Deshalb sollen hier nur die in biologischer Hinsicht nötigen minimalen Kenntnisse über die Chemie dieser Verbindungen dargestellt werden.

B. Synthese der Formazane

Da die Tetrazoliumsalze bis jetzt nur durch Oxydation der entsprechenden Formazane herstellbar sind, ist es verständlich, daß PECHMANN [11] und unabhängig von ihm BAMBERGER und WHEELRIGHT [1] 1892 zuerst die Formazane entdeckt bzw. synthetisiert haben.

Schon in dieser Zeit wurden für die Synthese der Formazane drei mögliche Wege festgestellt:

1. Diazoniumsalze und Aldehyd-Phenylhydrazone



Diese Reaktion läuft in alkalischer Lösung glatt ab, und bis heute ist dieser Weg zur Herstellung der Formazane der am häufigsten beschrittene. In der Zwischenzeit ist es gelungen, Diazoniumsalze statt mit Aldehyd-Phenylhydrazonen mit den verschiedenartigsten Verbindungen unter Formazanbildung reagieren zu lassen. Darüber berichtet NIENEHAM [8] ausführlicher.

2. Phenylhydrazin und Säure-Phenylhydrazide

Diese Reaktion hat ebenfalls Formazanbildung zur Folge. Statt Phenylhydraziden können auch verschiedene andere Verbindungen reagieren.

3. Phenylhydrazid-Chlorid und Phenylhydrazon

Diese Reaktion z. B. führt gleichfalls zur Bildung von Formazan.

C. Synthese der Tetrazoliumverbindungen

Die Synthese der Tetrazoliumverbindungen geschieht durch Oxydation der entsprechenden Formazane. Die bei diesem Schritt der Herstellung von Tetrazoliumverbindungen seit PECHMANN und RUNGE [12] erzielten Verbesserungen erstrecken sich im wesentlichen nur auf eine bessere Auswahl der Oxydationsmittel.

Da die Tetrazoliumverbindungen ziemlich teuer und auch nicht immer zugänglich sind, scheint es zweckmäßig, die Vorschrift der Synthese der zwei am häufigsten gebrauchten Tetrazoliumverbindungen hier anzugeben.

Die Vorschrift zur Herstellung von TTC, ausgearbeitet von MATTSON und Mitarbeitern [7], ist die folgende:

21,2 g (0,2 mol) frisch destillierter Benzaldehyd werden in 125 ml Methanol gelöst und 21,6 g (0,2 mol) Phenylhydrazin unter Rühren hinzugefügt. Das entstehende Hydrazon wird mit Methanol auf 1 l verdünnt und zu einer Lösung von 50 g NaOH und 70 g Natrium-Acetat in 1 l Methanol hinzugegeben. Diese Lösung wird auf 20°C abgekühlt und mit der Phenylidiazoniumchloridlösung versetzt, die folgendermaßen hergestellt wird:

Zu einer Mischung von 18,6 g Anilin (0,2 mol), 50 ml konzentrierter Salzsäure und 50 ml Wasser werden 14—15 g Natriumnitrat in kleinen Portionen unter ständigem Rühren hinzugefügt. Diese Lösung wird zu der vorherigen gegeben, und das Formazan fällt in kleinen roten Kristallen aus. Es wurde eine Formazanausbeute von 15,8 g (23%) erreicht. Der Schmelzpunkt des Formazans beträgt 170° C.

Von dem so erhaltenen Formazan werden 15 g (0,05 mol) in 100 ml Chloroform gelöst und die Lösung auf 20° C abgekühlt. Nach Zugabe von 30 g Bleitetraacetat verschwindet die rote Farbe. Das Chloroform wird abdestilliert und der Rückstand in Wasser gelöst. Man fügt Salzsäure hinzu und filtriert das entstandene Bleichlorid ab. Das monobasische Triphenyltetrazoliumchlorid wird aus dem Filtrat durch dreimalige Extraktion mit Chloroform entfernt. Das saure Salz bleibt dabei im Wasser (Wasser: Chloroform = 3:1). Die Chloroformlösung wird im Wasserbad eingeeengt und auf Zugabe von Äther kristallisiert das Tetrazoliumsalz in langen seidigen Nadeln.

Es wurden 9,7 g (auf das Formazan berechnet 57,7%) Triphenyltetrazoliumchlorid erhalten, dessen Schmelzpunkt 345° C beträgt.

Zur Herstellung von 3,3'-Dianisol-bis-4,4'-(3,5-Diphenyl)-Tetrazoliumchlorid (BT) geben RUTENBURG und Mitarbeiter [14] die folgende Vorschrift:

108 g Phenylhydrazin werden in einem Liter 90%igen Methanol gelöst, und unter Rühren werden 106 g frisch destillierter Benzaldehyd zugefügt. Es fällt ein gelbes kristallines Produkt aus. Dieses wird nach Abkühlung der Lösung auf 0° C abfiltriert und getrocknet. Als Ausbeute werden 175—180 g Benzaldehyd-Phenylhydrazon erhalten.

Davon werden 157 g in 1,2 l Pyridin aufgelöst und auf -5° C abgekühlt. Dazu werden 676 g stabilisiertes, tetraazotiertes Di-o-Anisidin in kleinen Portionen unter Rühren hinzugegeben. Die Temperatur, die sich während der Reaktion erhöht, wird mit einer Eis-Kochsalzmischung unter +5° C gehalten. Das Tetrazoliumsalz wird langsam zugefügt, und die nach Zugabe der einzelnen Portionen einsetzende Reaktion läßt man erst ablaufen, bevor man die nächste Portion zugibt. Die Zugabe der ganzen Menge von Tetrazoliumsalz dauert auf diese Weise ungefähr 2,5 h. Die trübe dunkelblaue Mischung wird dann auf Zimmertemperatur erwärmt und 2 h lang gerührt, bis die Gasentwicklung aufhört. Dann wird unter lebhaftem Rühren 1 l 50%iger Äthylalkohol dazugegeben. Das bläulichschwarze ausgeschiedene Formazan wird in einem Büchner-Trichter abfiltriert, einmal mit 250 ml 50%igem Äthylalkohol gewaschen, trockengesaugt und dann mit siedendem destillierten Wasser gründlich gewaschen. Das Produkt wird getrocknet, zu einem festen Pulver verrieben und nochmals mit heißem destillierten Wasser zur Beseitigung der anorganischen Salze 15 min gerührt. Das bläulichschwarze Produkt wird abgesaugt und mit heißem destillierten Wasser zehnmal gewaschen. Ausbeute an Diformazan 220—230 g, Schmelzpunkt 204—206° C.

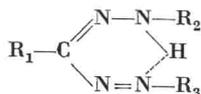
Von dem Diformazan werden 66 g in einen 2 l-Dreihalskolben, versehen mit Rührer und Tropftrichter, gebracht und 0,5 l 95%iger Äthylalkohol hinzugefügt. Dazu werden 58 g Amyl- oder Isoamylnitrit gegeben. Nun läßt man unter ständigem Rühren 49 g konzentrierte Salzsäure bei Zimmertemperatur in 1 h hinzutropfen. Tropfenweise werden weitere 8 g Amylnitrit und 6,5 g konzentrierte Salzsäure hinzugegeben. Das Diformazan wird dabei gelöst, und seine Farbe verschwindet während der Oxydation zum Ditetrazoliumchlorid. Die entstehende gelblichbraune Lösung wird nach 24stündigem Rühren von dem dunkelbraunen Niederschlag abfiltriert. Der Rückstand wird einmal mit heißem Äthylalkohol gewaschen und dann verworfen. Die Filtrate werden auf 0,5 l eingeeengt, in 2 l warmes Wasser gegossen und die Mischung durch Kochen auf 2 l eingeeengt. Der während der Einengung aufsteigende teerartige Schaum wird mit einem Spatel abgenommen und verworfen. Dann werden 5 g Aktiv-Kohle hinzugefügt, und die Lösung wird nach 15minütigem Kochen schnell abgesaugt. Das Filtrat wird auf 1,7—1,8 l eingeeengt und über Nacht stehengelassen. Dabei scheidet sich das Ditetrazoliumchlorid als lichtgelber Niederschlag aus. Das Produkt wird abfiltriert, mit wenig Äthylalkohol-Äther-Mischung (1:1) gewaschen und getrocknet. Die Ausbeute beträgt 24—27 g. Weitere 10—15 g sind durch wiederholtes Einengen des Filtrates zu gewinnen. Wenn die wäßrige Lösung des Ditetrazoliumchlorids zu sehr gesättigt ist, neigt das Produkt dazu, sich in einer teerartigen Form auszuscheiden. Diese erstarrt aber langsam beim Stehen.

Das Produkt kann durch Auflösung in Äthylalkohol oder Chloroform und nachfolgender Ausfällung mit Äther gereinigt oder aus Methanol-Äthylacetat-Mischung umkristallisiert werden. Die Oxydation mit Bleitetraacetat verläuft nach Angaben der Verfasser schlechter.

D. Eigenschaften der Formazane und Tetrazoliumverbindungen

Warum die Tetrazoliumverbindungen farblos und die Formazane farbig sind, kann auf Grund der Molekülstruktur bis jetzt in noch nicht befriedigender Weise erklärt werden.

Sowohl die Tetrazoliumverbindungen als auch die Formazane haben einen quasi-aromatischen Charakter, d. h. die Lage der Doppelbindungen kann formelmäßig nicht fixiert werden. Die Formazane verdanken ihre Ringstruktur dem Chelat-Charakter des Amino-Wasserstoffs. Die Struktur der Formazane sollte demnach eigentlich so geschrieben werden:



Die Reduktion der Tetrazoliumverbindungen ist leicht durchzuführen, die rückläufige Oxydation dagegen nur sehr schwer. Hierzu sind sehr starke Oxydationsmittel nötig.

Auch stereochemische und andere Probleme der Formazane und Tetrazoliumsalze wurden eingehend untersucht. Besonders auf Grund des optischen Verhaltens konnten in diesen Fragen größere Fortschritte erzielt werden (Absorptionsspektren, photochemische Reaktionen usw.).

Die Zahl der bis jetzt hergestellten Tetrazoliumsalze hat hundert schon überschritten. Der größte Teil davon ist aber nicht biologisch, sondern nur rein theoretisch bzw. organisch-chemisch interessant.

E. Anwendung der chemischen Reduktion der Tetrazoliumsalze

WEINER [17] beschreibt eine Nachweismethode für reduzierende Verbindungen folgendermaßen:

Zu 2 Tropfen der unbekanntten Verbindung oder zu einigen Kristallen derselben wird 1 ml Wasser gegeben (ist sie unlöslich, nimmt man Isopropanol). Nun werden 4 Tropfen n-NaOH und 4 Tropfen 0,1 %ige wäßrige TTC-Lösung hinzugesetzt und die Mischung nach Umschütteln einige Minuten stehengelassen. Das Auftreten einer roten Färbung bedeutet, daß die untersuchte Verbindung ein Reduktionsmittel war.

CHERONIS und STEIN [3] geben zum Nachweis von kleinen Mengen von organischen und anorganischen Reduktionsmitteln das folgende Verfahren an:

Zu 0,1 ml 1 %iger Tetrazoliumlösung werden in einem kleinen Reagenzglas 0,3 ml 0,3 n-NaOH und 0,5 ml Wasser gegeben. Die Mischung wird zum Sieden gebracht. Unter diesen Umständen darf noch keine Färbung auftreten. Danach werden 1–20 γ der zu untersuchenden Substanz in 0,1 ml eines geeigneten Lösungsmittels aufgelöst, hinzugegeben und die Lösung weitere 30 sec gekocht. Ist die untersuchte Verbindung ein Reduktionsmittel, so tritt eine starke Rotfärbung während des Kochens auf. Positive Reaktionen geben reduzierende Zucker, Ketosteroide, Ascorbinsäure, Aldehyde, Fe^{2+} , HS^- , S^{2-} , SnO_2^{2-} , SO_3^{2-} , PbO_2^{2-} usw. Die zwei letztgenannten Verbindungen reduzieren das BT nicht bis zum blauen Diformazan, sondern nur bis zum roten Monoformazan. Dieses wird dann durch stärkere Reduktionsmittel zum Diformazan weiterreduziert.

TREVELYAN und Mitarbeiter [15] verwendeten das TTC zum Nachweis von reduzierenden Zuckern auf Papierchromatogrammen. Die Papierstreifen werden nach der Trocknung mit 0,5 %iger chloroformischer TTC-Lösung besprüht, wieder getrocknet, mit alkoholischer NaOH besprüht und dann über Nacht liegengelassen. Die Stellen, an denen sich reduzierende Zucker befinden, werden durch Erscheinen von roten Flecken sichtbar. Die Färbung entwickelt sich schneller, wenn das Papier 5 min lang in einem feuchten Raum erwärmt wird. Nichtreduzierende Disaccharide, z. B. Saccharose oder Trehalose, geben die Reaktion nicht.

WALLENFELS [16] verwendete das TTC zum Nachweis und zur quantitativen Bestimmung verschiedener Zucker auf Chromatogrammen. Das eindimensionale Chromatogramm wird mit n-Butanol-Essigsäure-Wasser-Gemisch durchgeführt. Nach Beendigung wird das getrocknete Papier mit einer 1 : 1-Mischung von 2 %igem TTC

und n-NaOH besprüht und 20 min lang bei 40° C in einem wasserdampfgesättigten Raum gehalten. Danach wird das überflüssige TTC mit Wasser vorsichtig ausgewaschen und das Papier bei 25° C getrocknet. Die Zucker werden in roten Flecken auf dem weißen Papier sichtbar. Die Flecke zeigen scharfe Abgrenzungen. Bei höherer Trocknungstemperatur wird das Papier allmählich überall rot. Der Formazangehalt der Flecke hängt einerseits von der Art des Zuckers, andererseits von dessen Menge ab. Wenn man die roten Flecke ausschneidet und mit 10% konzentrierte Salzsäure enthaltendem Pyridin extrahiert, kann man die Menge des Formazans durch Photometrieren bestimmen. So hat der Verfasser zwischen der aufgetragenen Menge und dem Formazangehalt eine lineare Proportionalität gefunden. Verschiedene Zucker reduzieren das TTC verschieden stark. Deshalb muß für alle Zuckerarten eine Eichkurve aufgestellt werden. Auch die Identifizierung eines unbekanntes Zuckers ist auf Grund der gebildeten Formazanmenge möglich, wenn man zuvor bekannte Mengen des fraglichen Zuckers auf TTC einwirken läßt.

PADR, SMID und SICHU [9] beschreiben eine Methode zum Nachweis reduzierender Verbindungen (speziell von Vitamin C) auf Papierchromatogrammen mit Hilfe von TTC und BT. Das Laufenlassen der absteigenden oder Kreischromatogramme geschieht mit einem geeigneten Lösungsmittel. Am geeignetsten hat sich eine 4 : 1 : 3-Mischung von n-Butanol-Essigsäure-Wasser erwiesen. Nach Beendigung wird das Papier mit einer 1 : 1-Mischung von 0,5%igem TTC (oder BT) und n-NaOH besprüht, worauf die Flecke der anderen reduzierenden Stoffe sofort sichtbar werden (in roter bzw. blauer Farbe), während die der Zucker erst nach Erwärmung erscheinen. Die Reaktion ist für Vitamin C nicht spezifisch. Auch andere Reduktionsmittel geben eine positive Reaktion. Das schadet aber nichts, weil in den üblichen Lösungsmitteln der R_F -Wert des Vitamins C einen ziemlichen Unterschied zu denjenigen der anderen Reduktionsmittel und Zucker aufweist. In pharmazeutischen Präparaten, in welchen außer Vitamin C keine anderen reduzierenden Verbindungen anwesend sind, kann das Vitamin C auch quantitativ bestimmt werden. Aber auch in Obst usw. kann die quantitative Bestimmung der reduzierenden Verbindungen durch Trennung der Chromatogrammflecke vorgenommen werden. Die Nachweisempfindlichkeit des Vitamins C auf Chromatogrammen beträgt im Falle von TTC 15–20 γ , bei Verwendung von BT 10 γ .

MATTSON und JENSEN [6] arbeiteten eine Methode zur quantitativen Bestimmung von reduzierenden Zuckern aus:

Das zu untersuchende Material wird so verdünnt, daß in 10 ml Lösung 3–30 mg Laktose oder 0,3–2,7 mg Fruktose oder 1,5–19 mg Glukose oder 0,4–4,7 mg Invertzucker gelöst sind. 10 ml der so verdünnten Lösung stellt man in einen Thermostaten von 25° C, fügt nach einigen Minuten 10 ml n-NaOH hinzu und beläßt die Lösung weitere 6 min im Wasserbad. Dann gibt man 2 ml 0,4%ige TTC-Lösung hinzu und bringt die Probe nochmals (genau 30 min) ins Wasserbad. Nach Ablauf dieser Zeit werden 10 ml konzentrierte Salzsäure enthaltendes Pyridin hinzugefügt (15 ml konz. Salzsäure + 100 ml Pyridin). Die Lösung wird dadurch sauer, die Reduktion bleibt stehen und das Pyridin bringt das Formazan in Lösung, welches anschließend photometriert werden kann. Das Endergebnis wird mit Hilfe einer Eichkurve festgestellt. Die Steilheit der Eichkurven ist bei den verschiedenen Zuckern unterschiedlich. Die Verfasser haben die Methode zur Bestimmung von Laktose in Milch und Glukose und Fruktose nebeneinander in Honig ausprobiert. Die erhaltenen Ergebnisse waren in gutem Einklang mit den Werten, die durch andere Methoden erhalten wurden. Diese Bestimmung von Glukose und Fruktose nebeneinander geschieht mit

großer Genauigkeit durch Kombination der TTC-Methode mit einer anderen Bestimmungsmethode.

GERAUER [5] bestimmt die Reduktionsfähigkeit gewisser, zur Heilung von Hautkrankheiten dienender Salben in der Weise, daß er 10 g der zu untersuchenden Salbe mit 2,5 ml 1%iger TTC-Lösung vermischt und in einer 3 mm dicken Schicht 15 min lang mit UV-Licht bestrahlt. Danach wird das mit Butanol extrahierte Formazan photometriert. Aus den mitgeteilten Ergebnissen geht hervor, daß der Gehalt an Reduktionsmitteln in der Salbe und die gebildete Formazanmenge in einem nicht linearen Verhältnis stehen. Selbst der Verfasser betrachtet die Methode als eine semi-quantitative. Die offensichtliche Ursache der Abweichung ist damit zu erklären, daß das Licht nur in den oberen Teil der 3 mm dicken Schicht eindringen kann.

PEARSE [10] hat mit Tetrazoliumsalzen nach einer Inkubationszeit von einer Stunde bei 60° C und pH 12,8 in Gewebeschnitten Formazanbildung festgestellt, und zwar durch Einwirkung folgender Verbindungsgruppen:

1. Cystein, 2. Lipide oder Lipofuscin, 3. reduzierende Zucker. Deren Reaktionsfähigkeit mit den Tetrazoliumsalzen wurde auch durch „in vitro“-Versuche bestätigt. Die Unterscheidung der angeführten drei Gruppen von Verbindungen nebeneinander ist auf Grund der Tetrazoliumreaktion nicht möglich. Dazu müssen andere histochemische Reaktionen verwendet werden. Der Verfasser betont, daß der Reaktionsmechanismus und die Verwendungsmöglichkeiten noch nicht eingehend erforscht und daß dazu noch weitere Untersuchungen nötig sind.

BARNETT und SELIGMANN [2] inkubieren den entsprechend fixierten Gewebeschnitt zum simultanen Nachweis der SS- und SH-Gruppen 8–12 h lang in folgender Lösung:

48 ml 10%iges KCN + 2 ml n-NaOH + 25 mg BT.

Die SS-Gruppen werden durch den Einfluß von KCN reduziert und nehmen an der Reaktion mit dem Tetrazoliumsalz ebenfalls teil. Mit NT geht die Reaktion schneller. So ist eine 2–3 h lange Inkubation schon ausreichend. Obwohl die Tetrazoliumverbindungen außer von der SH-Gruppe auch von vielen anderen Verbindungen reduziert werden, welche in dem Gewebe anwesend sein können, ist die Methode nach Angaben der Verfasser trotzdem für SH-Gruppen spezifisch, weil die vorgeschriebene Vorbehandlung die übrigen Reduktionsmittel eliminiert.

FINDLAY [4] untersuchte die Reaktion von Cystein und NT „in vitro“ zur Feststellung, inwieweit die Tetrazoliummethode für den histochemischen Nachweis der SH-Gruppe zuverlässig ist. Die chemische Reaktion ist sehr unsicher, sowohl was den quantitativen Ablauf als auch was die Proportionalität mit der Konzentration des reagierenden Stoffes betrifft. Der pH-Wert, die Anwesenheit von Sauerstoff sowie von anderen Reduktionsmitteln beeinflussen die Entwicklung der Färbung in einer komplizierten Weise. Durch Thioglycerin wird das NT in zwei Schritten reduziert. Zuerst bildet sich Monoformazan, dann Diformazan. Äquivalente Mengen verschiedener SH-Verbindungen reagieren mit den Tetrazoliumsalzen in verschiedenem Ausmaß. Demzufolge ist die quantitative Abschätzung des histochemischen Bildes unsicher, abgesehen davon, daß die Reaktion, d. h. die Verfärbung, verhältnismäßig schwach ist. Trotzdem glaubt der Verfasser, daß die histochemischen Ergebnisse mit denjenigen, die durch andere Methoden erhalten wurden (z. B. mit „DDD“), vergleichbar sind, obwohl die Übereinstimmung nicht vollständig ist. Aber die Ergebnisse der histochemischen SH-Nachweise standen auch mit den chemischen Bestimmungen nicht in Einklang. Das Inkubieren geschieht bei pH 10, wo die reduzierenden Zucker noch nicht, die Enzyme nicht mehr reduzieren.

Für histochemische Zwecke kann die Methode am besten zum gemeinsamen Nachweis der SH- und SS-Gruppen verwendet werden. Zum getrennten Nachweis könnte man die SH-Gruppen blockieren und die SS-Gruppen nach Reduktion mit KCN nachweisen. Dazu scheint die Reaktion aber nicht in ausreichendem Maße geeignet zu sein.

Literatur II

- [1] BAMBERGER, E., und WHEELRIGHT, E., Ber. dtsch. Chem. Ges. **25**, 3201 (1892).
- [2] BARNETT, R. J., und SELIGMAN, A. M., J. Nat. Cancer Inst. **14**, 769 (1954).
- [3] CHERONIS, N. D., und STEIN, H., Chem. Educ. **33**, 120 (1956).
- [4] FINDLAY, G. H., J. Histochem. Cytochem. **3**, 331 (1955).
- [5] GERAUER, A., Derm. Wschr. **129**, 414 (1954).
- [6] MATTSON, A. M., und JENSEN, C. O., Anal. Chem. **22**, 182 (1950).
- [7] — — und DUTCHER, R. A., J. Am. Chem. Soc. **70**, 1284 (1948).
- [8] NINEHAM, A. W., Chem. Rev. **55**, 355 (1955).
- [9] PADR, Z., SMID, M., und SICHÖ, V., Naturwiss. **42**, 210 (1955).
- [10] PEARSE, A. G. E., J. Histochem. Cytochem. **1**, 460 (1953).
- [11] PECHMANN, H., Ber. dtsch. Chem. Ges. **25**, 3175 (1892).
- [12] — und RUNGE, P., Ber. dtsch. Chem. Ges. **27**, 2920 (1894).
- [13] RIED, W., Angew. Chem. **64**, 391 (1952).
- [14] RUTENBURG, A. M., GOFSTEIN, R., und SELIGMAN, A. M., Cancer Res. **10**, 113 (1950).
- [15] TREVELYAN, W. E., PROCTER, D. P., und HARRISON, J. S., Nature **166**, 444 (1953).
- [16] WALLENFELS, K., Naturwiss. **37**, 491 (1950).
- [17] WEINER, S., Chemist-Analyst. **37**, 56 (1948).

III. ELEKTROCHEMIE

A. Redoxpotential

KUHN und JERCHEL haben 1941 mitgeteilt, daß Tetrazoliumverbindungen von biologischen Substanzen enzymatisch zu Formazanen reduziert werden [18]. Für die eingehendere Untersuchung der Enzymsysteme mit diesen Substanzen ist es wichtig, die Redoxpotentialwerte der Tetrazoliumverbindungen und den Mechanismus der Reduktion zu kennen. So ist es verständlich, daß die erste Aufgabe von KUHN und JERCHEL in orientierenden Untersuchungen bestand, deren Ergebnisse in der oben zitierten Arbeit mitgeteilt wurden (Tabelle 1).

Tabelle 1

Formazanbildung aus 2,3-Diphenyl-5-n-hexyltetrazoliumchlorid unter Einfluß verschiedener Redoxindikatoren. Nach KUHN und JERCHEL [18].

| Indikator | E_0 (Volt) | Formazanbildung |
|--------------------------------|--------------|-----------------|
| Methylenblau | + 0,011 | — |
| Indigotetrasulfonat | — 0,046 | — |
| Altes gelbes Ferment | — 0,060 | — |
| Indigodisulfonat | — 0,125 | — |
| Kresylviolett | — 0,167 | + |
| Janusgrün | — 0,258 | + |
| Neutralrot | — 0,341 | + |
| Phenosafrafin | — 0,525 | + |

Anmerkung: 10^{-2} mol Indikator wurde mit Natriumdithionit bis zu 50% reduziert. Das zugesetzte Tetrazoliumsalz ist ebenfalls 10^{-2} mol in 10^{-1} mol neutralem Phosphatpuffer.

Es wurde festgestellt, daß das Redoxpotential des untersuchten Tetrazoliumsalzes zwischen $-0,17$ und $-0,26$ V liegt. Nach einigen Jahren haben JERCHEL und MÖHLE [16] zur genauen Bestimmung des Redoxpotentials des Systems TTC/TF die in solchen Fällen gebräuchliche Redoxtitration versucht, aber ohne Erfolg. Daraus konnte geschlossen werden, daß man es hier mit einem irreversiblen System zu tun hat. Diese Annahme wird durch präparative Arbeiten unterstützt. Das TTC kann sehr leicht zu Triphenylformazan reduziert werden, jedoch ist eine Oxydation des Formazans zu TTC nur mit starken Oxydationsmitteln möglich (Bleitetraacetat, Amylnitrat, Quecksilberoxyd usw.). Deswegen ermittelten die zitierten Autoren anstatt des Redoxpotentials das scheinbare Reduktionspotential. Der Unterschied zwischen beiden ist folgendermaßen zu verstehen: