

KURZE MITTEILUNGEN

Bis am 20. des Monats bei der Redaktion eingehende kurze Mitteilungen werden in der Regel am 15. des folgenden Monats veröffentlicht

Über Farbreaktionen von Uronsäuren mit Thiobarbitursäure*

Die Farbreaktion der Thiobarbitursäure (TBS) mit Abbauprodukten von Fetten ist heute ein viel verwendeter Test zur Bestimmung der Fettranzigkeit¹. Nach den Untersuchungen von SINNHUBER, YU und YU² sowie SCHMIDT^{1,3} handelt es sich bei der Bildung des roten Farbstoffes (λ max. = 532 m μ) um eine Reaktion des bei der Fettoxydation gebildeten Malondialdehydes (bzw. seiner Enolform, dem β -Hydroxyacrolein) mit TBS. Außer Malondialdehyd bilden mit TBS noch eine Reihe weiterer Substanzen, wie Glyoxal, *p*-Hydroxybenzaldehyd, β -Ketoaldehyde und Glutakondialdehyd, Farbstoffe mit charakteristischen Absorptionsmaxima³. Die Farbreaktion scheint vor allem mit Dicarbonylverbindungen einzutreten, die durch Reaktion mit zwei Molekeln TBS ein System konjugierter Doppelbindungen ausbilden können.

Zucker und Polysaccharide reagieren im allgemeinen nicht mit TBS⁴. Hingegen kann eine TBS-Reaktion eintreten, wenn die Zucker zu reaktionsfähigen Carbonylverbindungen noch unbekannter Konstitution abgebaut werden, z. B. durch Erhitzen mit Aminosäuren⁴ oder Behandlung mit Kathodenstrahlen⁵. Die TBS-Reaktion ist auch zur Bestimmung von 2-Desoxyzuckern vorgeschlagen worden, die bei der Oxydation mit Perjodat Malondialdehyd bilden⁶. Eine Anwendung dieser Methode auf 2-Keto-3-desoxyheptonsäure zeigte, daß daraus durch Perjodat, anstelle von Malondialdehyd, Formylbrenztraubensäure gebildet wird, welche mit TBS einen rosaroten Farbstoff (λ max. = 545 bis 550 m μ) bildet⁷. Es sei erwähnt, daß auch Glyoxal einen TBS-Farbstoff mit gleichem Absorptionsmaxima gibt³.

* Eingang: 7. April 1960.

¹ Vgl. z. B. H. SCHMIDT, *Fette, Seifen, Anstrichmittel* 61 (1959) 127.

² R. O. SINNHUBER, T. C. YU und T. C. YU, *Food Res.* 23 (1958) 626.

³ H. SCHMIDT, *Fette, Seifen, Anstrichmittel* 61 (1959) 881.

⁴ A. STEIGMANN, *Sci. Ind. Phot.* 21 (1950) 10.

⁵ H. STREULI, *Mitt. Lebensm. Hyg.* 47 (1956) 221.

⁶ V. S. WARAVDEKAR und L. D. SASLAW, *J. Biol. Chem.* 234 (1959) 1945.

⁷ A. WEISSBACH und H. HURWITZ, *ibid.* 234 (1959) 705.

Anlaß für die vorliegende Untersuchung gab eine kürzliche, interessante Beobachtung von STEIGMANN⁸, wonach Gelatine nach Behandlung mit Alkali einen rosaroten TBS-Farbstoff bildet. Von den untersuchten Kohlehydraten, welche für diese Reaktion in Frage kommen, gab einzig Glucuronsäure nach Alkalibehandlung mit TBS den gleichen Farbstoff, während Galakturonsäure unter gleichen Bedingungen nicht reagierte. Es schien daher von Interesse, die Reaktion von Uronsäuren mit TBS etwas näher zu studieren.

Zuerst wurde untersucht, wie sich die drei häufigsten Uronsäuren, Galakturonsäure, Glucuron (Lacton der Glucuronsäure) und Mannuron (Lacton der Mannuronsäure) beim Erhitzen mit TBS in schwach saurer Lösung verhalten, unter Bedingungen, wie sie zur Bestimmung der Fettranzigkeit verwendet werden¹. Dazu wurde je 1 ml der Uronsäurelösungen (2 bis 8 mg Uronsäure) mit 5 ml 0,5 N HCl und 10 ml 0,01 M TBS-Lösung $\frac{1}{2}$ bis 8 Stunden im Wasserbad erhitzt (Reagenzglas mit Schliff). Es bildete sich dabei eine dunkelrote Färbung, deren Intensität mit der Erhitzungszeit stark zunahm; für die Bildung von gut meßbaren Färbungen mußte etwa 4 Stunden lang erhitzt werden. Das Absorptionsmaxima der Farbstoffe lag bei 510 $m\mu$. Die Extinktionswerte bei 510 $m\mu$ aus Galakturonsäure, Mannuron und Glucuron verhielten sich wie 100:75:50.

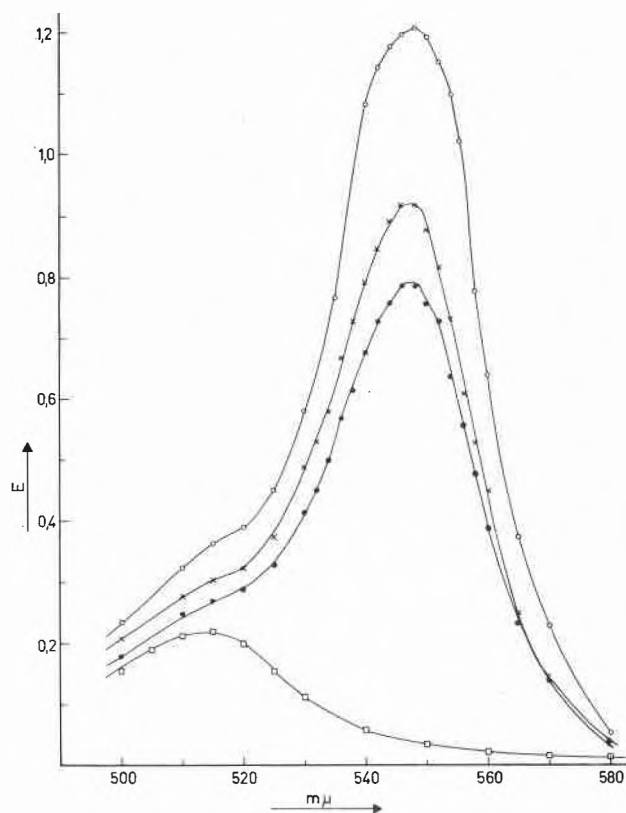


Abb. 1. Absorptionsspektren der TBS-Farbstoffe von Uronsäuren nach Alkalibehandlung

- Methylglucuronosid (0,55 mg)
- ×—× Mannuron (6,6 mg)
- Glucuron (13,2 mg)
- Galakturonsäure (21,2 mg)

⁸ A. STEIGMANN, *Sci. Ind. Phot.* 29 (1958) 260.

Der dunkelrote Farbstoff konnte durch halbstündiges Erhitzen von 2,6 g Galakturonsäure mit 3,8 g TBS und 400 ml HCl (12%) als unlösliches Pulver erhalten werden. Der in Wasser schwer lösliche Farbstoff erwies sich papierchromatographisch (Laufmittel: Tetrahydrofuran-H₂O, 1 : 1) als uneinheitlich und wurde nicht weiter untersucht.

Es ist wahrscheinlich, daß für die Bildung dieses Farbstoffes ein Zwischenprodukt des sauren Uronsäureabbaues⁹ verantwortlich ist (vielleicht α -Ketoglutardialdehyd). Die gleiche Verbindung dürfte auch bei der bekannten Naphthoresorcinreaktion der Uronsäuren nach TOLLENS¹⁰ für die Bildung des blauviolettten Farbstoffes in Frage kommen. Daß eine gewisse Analogie zwischen der Reaktionsfähigkeit von Naphthoresorcin und TBS besteht, geht daraus hervor, daß Naphthoresorcin auch mit Malondialdehyd unter Bildung eines intensiv grünen Farbstoffes reagiert (λ max. = 640 $m\mu$). — Reduktinsäure gab mit TBS keinen Farbstoff, während Furfurol eine dunkelgelbe Färbung bildete.

Werden die Uronsäuren, vor Ausführung der TBS-Reaktion, kurze Zeit mit Lauge bei Zimmertemperatur behandelt, so wird die Bildung eines anderen, rosaroten

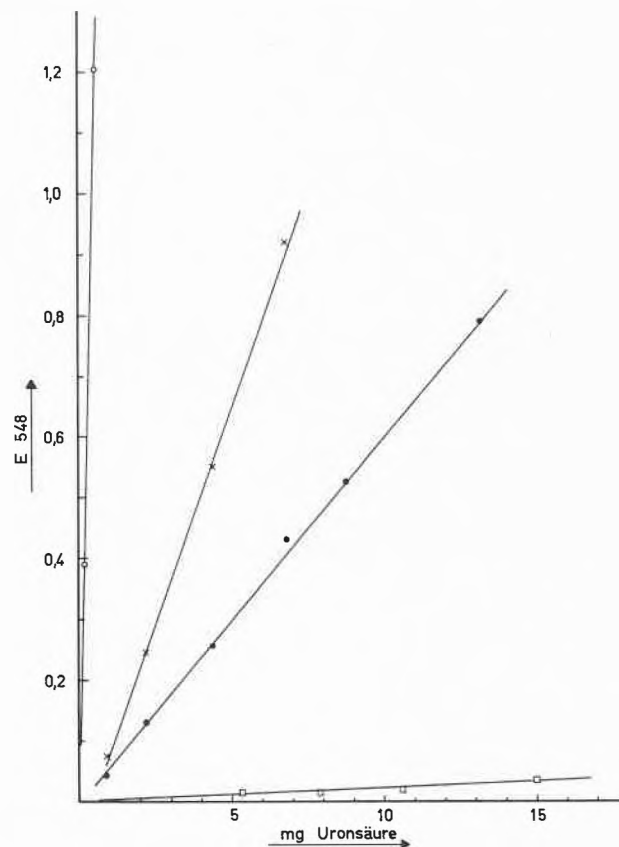


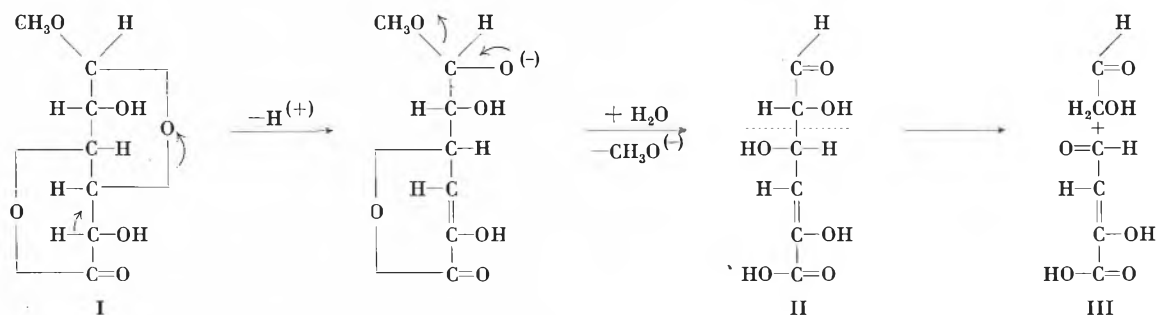
Abb. 2. Eichkurven alkalibehandelter Uronsäuren

- Methylglucuronosid
- ×—× Mannuron
- Glucuron
- Galakturonsäure

⁹ E. STUTZ und H. DEUEL, *Helv. Chim. Acta* 41 (1958) 1722.

¹⁰ B. TOLLENS und F. RORIVE, *Ber. dtsch. chem. Ges.* 41 (1908) 917.

Farbstoffes mit einem Absorptionsmaxima von 548 $m\mu$ beobachtet (Abb. 1). Zur Ausführung der Reaktion gibt man zu 2 ml der Uronsäurelösung 0,2 ml 1 N NaOH und läßt $\frac{1}{2}$ Stunde bei Zimmertemperatur stehen. Darauf gibt man 2,5 ml 1 N HCl und 10 ml 0,01 M TBS-Lösung zu und bringt das Volumen mit 1,3 ml Wasser



auf 16 ml. Man erhitzt $\frac{1}{2}$ Stunde im siedenden Wasserbad. – Werden die Uronsäuren mit NaOH erhitzt, so bildet sich kein rosaroter TBS-Farbstoff.

Aus Abb. 1 und 2 ist ersichtlich, daß Glucuron, Mannuron und Methylglucuronosid [γ -Lacton des Methyl- β -Glucosylfuranosids (I)] den rosaroten Farbstoff geben. Bei der Galakturonsäure bewirkt die Alkalibehandlung keine Veränderung, es bildet sich lediglich der oben beschriebene rote Farbstoff, dessen Maximum bei 510 bis 515 $m\mu$ liegt; infolge der kurzen Erhitzungsdauer ist dieses nur schwach ausgebildet. Interessanterweise ist die Farbbildung beim Methylglucuronosid etwa 50mal stärker als beim Glucuron (Abb. 2). Auch das Mannuron ergibt eine deutlich stärkere Farbreaktion als Glucuron. Im weiteren wurde beobachtet, daß das Na-Glucuronat (hergestellt nach HACH und BENJAMIN¹¹) sich wie Galakturonsäure verhält, d. h. kein Maximum bei 548 $m\mu$ bildet. Daraus geht hervor, daß das Vorliegen eines γ -Lactonringes in Furanoseform Voraussetzung für die Bildung des rosaroten Farbstoffes nach Alkalibehandlung zu sein scheint. Von dieser Gruppierung ist seit langem bekannt, daß sie durch Alkalieinwirkung sehr leicht zu ungesättigten, reduzierenden Verbindungen abgebaut wird¹². Die Bildung des rosaroten Farbstoffes ($\lambda_{\max.} = 548 m\mu$) macht es sehr wahrscheinlich, daß bei diesem Abbau Formylbenzotribenzensäure gebildet wird, da diese mit TBS einen Farbstoff mit genau gleichem Absorptionsmaxima bildet⁷. Die Bildung des glei-

chen TBS-Farbstoffes mit Glyoxal kann durch Kondensation von Glyoxal zu Formylbenzotribenzensäure erklärt werden³. Die Entstehung der Formylbenzotribenzensäure beim alkalischen Abbau von furanoiden γ -Lactonen der Uronsäuren wie z. B. I verläuft wahrscheinlich über folgende Stufen:

Die Abspaltung eines Protons am C₅ und Öffnung des Furanoseringes führt zunächst zu einem ungesättigten Glykosylanion, das sofort CH_3O^- abspaltet und durch Öffnung des Lactonringes die Verbindung II bildet, die mit der Ketoform im Gleichgewicht ist. Aus II entsteht durch Aldolspaltung Glykolaldehyd und Formylbenzotribenzensäure (III, Enolform).

Der Grund für die stark erhöhte Farbstoffbildung beim Methyl- β -glucuronosid dürfte in der beträchtlich größeren Stabilität des Lactonringes beruhen, wodurch die Alkaliempfindlichkeit erhöht wird¹³. Das verwendete Mannuron (Smp. 188°) dürfte ebenfalls als γ -Lacton in der Furanoseform reagieren, obschon das kristalline Lacton mit diesem Schmelzpunkt in der Pyranoseform vorliegt¹⁴.

Glucose und Arabinose gaben nach Alkalibehandlung mit TBS keine Färbung.

Die Bildung des rosaroten TBS-Farbstoffes nach Alkalibehandlung dürfte sich für die Unterscheidung von Uronsäuren und die Bestimmung der furanoiden γ -Lactone der Uronsäuren sowie ihrer Glykoside verwenden lassen.

Herrn Prof. Dr. H. DEUEL danke ich für seine Unterstützung und sein Interesse an dieser Arbeit. Herrn PD Dr. A. ESCHENMOSER danke ich für seine Anregungen betreffend Reaktionsmechanismen.

¹³ E. M. OSMAN, K. C. HOBBS und W. E. WALSTON, *J. Amer. Chem. Soc.* 73 (1951) 2726.

¹⁴ F. G. FISCHER und H. DÖRFEL, *Z. physiol. Chem.* 302 (1955) 187.

H. NEUKOM

Agrikulturchemisches Institut der ETH, Zürich

¹¹ W. HACH und D. G. BENJAMIN, *J. Amer. Chem. Soc.* 76 (1954) 917.

¹² L. N. OWENS, S. PEAT und W. J. G. JONES, *J. Chem. Soc.* 1941, 339; F. SMITH, *Advances Carbohydrate Chem.* 2 (1946) 79.