

Eine Methode zur Schnellbestimmung von Methylglyoxal.

Von

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

Aus dem Institut für Organische Chemie der Technischen Hochschule Wien.
(Eingelangt am 23. Okt. 1951. Vorgelegt in der Sitzung am 8. Nov. 1951.)

Beim Zerfall der Zucker unter der Einwirkung von Alkalien¹ spielt das Methylglyoxal als Zwischenprodukt bei der Milchsäurebildung, welche als eine der letzten Stufen des alkalischen Abbaues auftritt, eine große Rolle.

Es wurde daher vielfach versucht, das äußerst reaktionsfähige Methylglyoxal eindeutig analytisch zu erfassen. Allerdings sind die meisten Methoden nicht genug selektiv, sondern sprechen auch auf andere beim alkalischen Zuckerabbau auftretende Bruchstücke an, wie Glycerinaldehyd, Dioxyceton, Acetol, Brenztraubensäure usw.

Zwei dieser Verfahren scheinen geeignet, das Methylglyoxal auch neben Triosen und Hexosen quantitativ zu bestimmen; die Methode nach *Ariyama*² (quantitativ kolorimetrisch) und die Fällung des Methylglyoxals nach *Spoehr* und *Strain*³ mit m-Nitrobenzhydrazid. Auch die polarographische Bestimmung⁴, die in letzter Zeit versucht wurde, ergibt einige Möglichkeiten.

Wir haben die Methode nach *Spoehr* und *Strain* bei unserer Arbeit¹ über den alkalischen Zuckerabbau überprüft und als absolut zuverlässig erkannt. Als gravimetrische Methode ist die Bestimmung des Methylglyoxals als Bis-m-nitrobenzhydrazon für fortlaufende Reihenbestimmungen beim Zuckerabbau z. B. im alkalischen Medium mit einer gewissen Schwerfälligkeit behaftet und es wurde daher versucht, die Methode zu einer Schnellbestimmung auszubauen. Durch Verfeinerung des

¹ E. Waldmann und V. Prey, Mh. Chem. 82, 856 (1951).

² H. Ariyama, J. biol. Chemistry 77, 359 (1928).

³ H. A. Spoehr und H. H. Strain, J. biol. Chemistry 89, 503 (1930).

⁴ F. Wessely, M. Pantlitschko und J. Wratil, Wien. klin. Wschr. 60, Nr. 25 (1949).

Fällungsvorganges wurde erreicht, daß die Fällung des Methylglyoxals sofort und quantitativ erfolgt. Die analytische Erfassung des noch nassen Niederschlages wird durch die Bestimmung der Nitrogruppen des Bis-m-nitrobenzhydrazons mit Titantrichlorid⁵ erreicht. Die Bestimmung des Methylglyoxals kann solcherart in längstens 15 bis 20 Min. vollständig durchgeführt werden.

Es konnte gezeigt werden, daß diese Schnellmethode geeignet ist, Methylglyoxal auch in Gegenwart von Triosen und Hexosen in kürzester Zeit hinreichend genau zu bestimmen. Die untere Erfassbarkeitsgrenze liegt bei $6 \cdot 10^{-4}$ g/ccm auch in Gegenwart eines Überschusses von Triosen und Hexosen (Tabellen 1, 2, 4, 5, 6, 7). Ausnahmen bilden Dioxyaceton, das nur bis zu einem siebenfachen Überschuß die Methylglyoxalbestimmung nicht stört (Tabelle 3), und Glyoxal, das unter den Analysenbedingungen quantitativ erfaßt wird; Diacetyl spricht nicht an.

Der Versuch, an Stelle von m-Nitrobenzhydrazid 2,4-Dinitrobenzhydrazid als Fällungsreagens zu verwenden, scheiterte.

Experimenteller Teil⁶.

Fällungsreagens: Eine 2%ige Lösung von m-Nitrobenzhydrazid⁷ in 10%iger Essigsäure.

Die zu untersuchende Methylglyoxallösung wird in ein kleines Becherglas pipettiert, möglichst nicht mehr als 10 bis 15 mg Methylglyoxal (da sonst der Verbrauch an Titantrichlorid zu groß wird) und mit der heißen Lösung des Fällungsreagens versetzt, wobei das m-Nitrobenzhydrazid in ungefähr 20fachem Überschuß vorhanden sein soll. Nach Zugabe des Fällungsmittels scheidet sich das Dihydrazon schlagartig als weißer voluminöser Niederschlag aus, wobei das Methylglyoxal sofort quantitativ erfaßt wird.

Nach dem Fällen wird über schwacher Flamme erhitzt, wodurch sich der Niederschlag zusammenballt und gut filtrierbar wird (Schwarzbandfilter). Nach dem Filtrieren wird zuerst mit heißer, 10%iger Essigsäure, darnach 3mal mit heißem Wasser gewaschen. Die Dauer der Fällung bis zur Beendigung des Nachwaschens mit Wasser beträgt höchstens 10 Min.

Es hat sich gezeigt, daß die Analysenergebnisse am besten sind, wenn die Titration möglichst anschließend an die Fällung des Bis-hydrazons erfolgt. Die dazwischenliegende Zeitspanne soll nicht mehr als 2 Stdn. betragen. Bei längerem Zuwarten wird ein Teil des Niederschlages durch Titantrichlorid unreduzierbar und die Analysenergebnisse fallen dadurch zu niedrig aus.

Zur Titration wird in einem Titrierkolben die Luft durch CO₂ verdrängt und ein gemessenes Volumen Titantrichloridlösung vorgelegt. Man fügt zur siedenden Lösung 60 ccm einer heißen 3,7%igen Salzsäurelösung hinzu und bringt in den kochenden Kolbeninhalt das Filter mit dem Niederschlag

⁵ E. Knecht und E. Hibbert, Ber. dtsch. chem. Ges. **36**, 166, 1549 (1903).

⁶ Diplomarbeit F. Ludwig, Juli 1950.

⁷ Th. Curtius und O. Trachmann, J. prakt. Chem. (2) **51**, 169 (1895); für die Analyse muß ein Schmp. von 152° und vollständige Löslichkeit des m-Nitrobenzhydrazids in siedendem Wasser verlangt werden.

des Methylglyoxal-bis-m-nitrobenzhydrazons ein. Man kocht 5 Min., wobei die anfängliche Trübung in dem Maße verschwindet, als sich aus den Nitrogruppen durch Reduktion das Amin bildet und dieses als Hydrochlorid in Lösung geht. Erst gegen Ende des Kochens wird die Lösung durch das Filter, welches allmählich zerfasert, wieder trübe. Es wird jetzt rasch abgekühlt und anschließend der Titantrichloridüberschuß mit Ferriammoniumsulfat bei Gegenwart von Rhodankalium zurücktitriert. Der Gehalt der Titantrichloridlösung muß vor jeder Versuchsreihe neu bestimmt werden. Ebenso ist bei jeder Versuchsreihe eine Blindprobe (Filter) notwendig, die bei den Analysenergebnissen berücksichtigt werden muß. Bei der Titration empfiehlt es sich, einen zirka 20%igen Überschuß an Titantrichlorid anzuwenden.

Die Bestimmung des Methylglyoxal-bis-m-nitrobenzhydrazon ergab, daß an Stelle von 12 Molen Titantrichlorid pro 1 Mol Bis-hydrazon 14 Mole Titantrichlorid notwendig sind. Versucht man die Reduktion einer Methylglyoxallösung ohne vorherige Fällung mit m-Nitrobenzhydrazid mit Titantrichlorid, so werden pro 1 Mol Methylglyoxal quantitativ 2 Mole Titantrichlorid verbraucht.

Eingesetztes Methylglyoxal: je 25 ccm einer Lösung von 1,125 mg/l ccm.

	Verbrauch g $TiCl_3$ pro 25 ccm	entsprechend einem Methylglyoxalgehalt pro ccm
a)	0,1139	1,063
b)	0,1164	1,087
c)	0,1171	1,093

Dies könnte allenfalls bedeuten, daß das Methylglyoxal-bis-m-nitrobenzhydrazon beim Sieden mit der 3,7%igen Salzsäure gespalten wird, wobei dann durch das $TiCl_3$ einerseits die zwei Nitrogruppen des m-Nitrobenzhydrazids (12 $TiCl_3$), andererseits das Methylglyoxal (2 $TiCl_3$) reduziert werden⁸.

Daher ist bei der Bestimmung des Methylglyoxals als Bis-m-nitrobenzhydrazon und Reduktion desselben mit $TiCl_3$ die Berechnung der Analyse so zu stellen, daß für 1 Mol Methylglyoxal 14 Mole $TiCl_3$ verbraucht werden. Nimmt man die Durchführung der Analyse unter Berücksichtigung des oben Gesagten vor, so erhält man einwandfreie Resultate.

Die Titerstellung des Titaniters erfolgt in der Weise, daß eine abgewogene Menge der Urtitersubstanz (analysenreines m-Nitrobenzhydrazid⁷) mit $TiCl_3$ nach *Knecht* und *Hibbert* bestimmt wird.

Das Verhältnis der auf Grund der Reaktionsgleichung (6 $TiCl_3$ reduzieren 1 m-Nitrobenzhydrazid) notwendigen Titantrichloridmenge zu der tatsächlich verbrauchten Menge (siehe oben) ergibt den Faktor (f).

Da bei der Bestimmung des Methylglyoxals für 1 Mol Methylglyoxal (72 g) 14 Mole $TiCl_3$ (2159,78 g) verbraucht werden, entspricht 1 g $TiCl_3$ (0,0033336 · f) g Methylglyoxal.

Der Gehalt der Titerlösung an $TiCl_3$ wird durch Vergleich mit einer gestellten Ferriammoniumsulfatlösung ermittelt.

⁸ Die Reduktion von Carbonylgruppen mit $TiCl_3$ wird von uns weiter bearbeitet und es wird darüber später berichtet werden.

Versuchsergebnisse.

Verwendete Methylglyoxallösung: 0,0044 g Methylglyoxal in 10 ccm (Bestimmung jodometrisch).

10 ccm obiger Methylglyoxallösung wurden mit 20 ccm 2%iger m-Nitrobenzhydrazidlösung gefällt, gewaschen und noch feucht mit Titantrichloridlösung titriert:

Tabelle 1.

	Verbrauchte g $TiCl_3$	g $TiCl_3 \cdot f$	g Methylglyoxal + Blindwert	g Methylglyoxal in 10 ccm
1. Versuchsreihe:				
1.	0,1362	0,1430	0,00477	0,00443
2.	0,1382	0,1394	0,00484	0,00450
3.	0,1514	0,1590	0,00530	0,00496
Blindversuch..	0,0097	0,0102	0,00034	
2. Versuchsreihe:				
1.	0,1571	0,1650	0,00531	0,00444
2.	0,1571	0,1650	0,00531	0,00444
3.	0,1534	0,1611	0,00537	0,00450
Blindversuch..	0,0249	0,0261	0,00087	
3. Versuchsreihe:				
1.	0,1454	0,1527	0,00509	0,00447
2.	0,1466	0,1539	0,00513	0,00451
3.	0,1443	0,1515	0,00505	0,00443
Blindversuch..	0,0177	0,0186	0,00062	

Titration von Methylglyoxal in Gegenwart von Glycerinaldehyd:
Methylglyoxallösung: 0,00982 g/ccm.
Glycerinaldehydlösung: 0,01 g/ccm.

Tabelle 2.

ccm Methylglyoxal	ccm Glycerinaldehyd	Verhältnis Methylglyoxal: Glycerinaldehyd	g Methylglyoxal
1	1	zirka 1: 1	0,00982
1	3	„ 1: 3	0,00983
1	5	„ 1: 5	0,00982
1	7	„ 1: 7	0,00985
1	10	„ 1: 10	0,00983

Bestimmung von Methylglyoxal in Gegenwart von Dioxyaceton.

1. Versuchsreihe:

Methylglyoxallösung: 0,00140 g/ccm.
Dioxyacetonlösung: 0,01 g/ccm.

Tabelle 3a.

ccm Methylglyoxal	ccm Dioxyaceton	Verhältnis Methylglyoxal: Dioxyaceton	g Methylglyoxal pro ccm
5	0,5	1 : 0,7	0,00142
5	1,0	1 : 1,43	0,00142

2. Versuchsreihe:

Methylglyoxallösung: 0,00982 g/ccm.

Dioxyacetonlösung: 0,01134 g/ccm.

Tabelle 3b.

ccm Methylglyoxal	ccm Dioxyaceton	Verhältnis Methylglyoxal: Dioxyaceton	g Methylglyoxal
1	1	1 : 1	0,00982
1	3	1 : 3,3	0,00983
1	5	1 : 5,6	0,00983
1	6	1 : 6,8	0,00981
1	8	1 : 9	0,00980
1	10	1 : 11	verharzt

Die Titration von Methylglyoxal neben Dioxyaceton wurde wie die vorhergehende mit Glycerinaldehyd durchgeführt. Bis zu einem Verhältnis 1 : 6 zeigten die Ergebnisse der Titration keine besonderen Abweichungen. Bei der Konzentration 1 : 7 wurde der Niederschlag beim kurzen Erwärmen nach der Fällung etwas braun, er ballte sich aber noch ziemlich gut zusammen; scheinbar ging ein Teil durch das Filter, so daß das Ergebnis schon etwas zu nieder war. Um die Braunfärbung, die auf eine Zersetzung hinwies, zu vermeiden, wurde nicht länger erwärmt, sondern gleich nach der Fällung filtriert, wobei schon wesentliche Mengen durch das Filter gingen, so daß der Wert schon erheblich niedriger ausfiel. Bei der Konzentration 1 : 11 wurde wieder länger erwärmt, um eine Zusammenballung des Niederschlages zu erreichen, dabei trat vollkommene Verharzung ein.

Titration von Methylglyoxal in Gegenwart von Acetol.

1. Versuchsreihe:

Methylglyoxallösung: 0,00140 g/ccm.

Acetollösung: 0,01 g/ccm.

2. Versuchsreihe:

Methylglyoxallösung: 0,00982 g/ccm.

Acetollösung: 0,01257 g/ccm (Bestimmung jodometrisch).

Tabelle 4.

	ccm Methylglyoxal	ccm Acetol	Verhältnis Methylglyoxal: Acetol	g Methyl- glyoxal in 1 ccm
1.	5	0,5	1 : 0,7	0,00142
	5	1,0	1 : 1,43	0,00142
2.	1	1	1 : 1,2	0,00982
	1	5	1 : 6	0,00983
	1	10	1 : 12	0,00981

Titration von Methylglyoxal in Gegenwart von Brenztraubensäure.
 Methylglyoxallösung: 0,00982 g/ccm.
 Brenztraubensäurelösung: 0,00986 g/ccm (Bestimmung jodometrisch).

Tabelle 5.

ccm Methylglyoxal	ccm. Brenztrauben- säure	Verhältnis Methylglyoxal : Brenztrauben- säure	g Methylglyoxal
1	1	1 : 1	0,00982
1	5	1 : 5	0,00981
1	10	1 : 10	0,00981

Titration von Methylglyoxal in Gegenwart von Glucose.

1. Versuchsreihe:
 Methylglyoxallösung: 0,00140 g/ccm.
 Glucoselösung: 0,01 g/ccm.
2. Versuchsreihe:
 Methylglyoxallösung: 0,00982 g/ccm.
 Glucoselösung: 0,01025 g/ccm.

Tabelle 6.

	ccm Methylglyoxal	ccm Glucose	Verhältnis Methylglyoxal : Glucose	g Methyl- glyoxal in 1 ccm
1.	5	0,5	1 : 0,7	0,00142
	5	1,0	1 : 1,43	0,00141
2.	1	1	1 : 1	0,00982
	1	5	1 : 5	0,00984
	1	10	1 : 10	0,00982

Da die Beimengungen von Acetol, Brenztraubensäure, Glucose, Dioxy-
 acetol und Glycerinaldehyd, wie gezeigt wurde, ohne störenden Einfluß
 auf die Bestimmung von Methylglyoxal sind, wurde versucht, das Methyl-
 glyoxal in Gegenwart aller dieser Substanzen und von Diacetyl zu bestimmen.

Methylglyoxallösung: 0,012008 g/ccm.

Lösung des Gemisches: 0,006 g Brenztraubensäure, 0,006 g Glucose,
 0,006 g Diacetyl, 0,006 g Acetol, 0,006 g Dioxyacetol, 0,006 g Glycerin-
 aldehyd/ccm.

Tabelle 7.

ccm Methylglyoxal	ccm Gemisch	Verhältnis Methylglyoxal : Gemisch	g Methyl- glyoxal in 1 ccm
2	0,5	4 : 3	0,01200
2	1	2 : 3	0,01200
2	2	1 : 3	0,01204