

Zur Kenntnis des alkalischen Zuckerabbaues.

III. Mitteilung: Versuch zur polarographisch-analytischen Erfassung einiger Abbauprodukte.

Von

W. Stoll, E. Waldmann, V. Prey und H. Berbalk.

Aus dem Institut für Organische Chemie der Technischen Hochschule in Wien.

Mit 14 Abbildungen.

(Eingelangt am 5. April 1952. Vorgelegt in der Sitzung am 24. April 1952.)

I. Problemstellung.

Der alkalische Zuckerabbau verläuft nach den derzeitigen Ansichten unter Bildung von Bruchstücken, wie Glycerinaldehyd, Dioxyaceton, Methylglyoxal, Acetol usw., die während des Abbaues noch weiter verändert werden können.

Von diesen Stoffen werden nur wenige, wenn sie im Gemisch vorliegen, nach bisher angewandten Methoden einwandfrei analytisch erfaßt. Überdies werden viele dieser Körper schon bei der analytischen Bestimmung durch die verwendeten Agenzien bzw. durch das dabei notwendige pH umgewandelt. Wir suchten daher nach neuen analytischen Methoden.

Da z. B. Methylglyoxal, Dioxyaceton, Glycerinaldehyd, Acetol, Brenztraubensäure, Glyoxal, Milchsäurealdehyd, Diacetyl, Formaldehyd und Aceton schon polarographisch vermessen wurden¹, versuchten wir diese Methode zur qualitativen und quantitativen Trennung der Abbauprodukte des alkalischen Zuckerabbaues heranzuziehen.

Zunächst waren die schon beschriebenen Messungen zu überprüfen, eventuell richtigzustellen, da über die verwendeten Puffer und Bezugspotentiale nicht überall entsprechende Angaben vorlagen. Die polarographischen Kurven der Spaltstücke des Zuckerabbaues liegen teilweise

¹ M. v. Stackelberg, Polarographische Arbeitsmethoden, Übersichtsreferat, S. 399—429. 1950. — J. Wrátil, Dissertation, Universität Wien (1948). — F. Wessely, M. Panlítschko und J. Wrátil, Wien. klin. Wschr. 60, Nr. 25. — P. Zuman, Nature (London) 65, 485 (1950). — G. Mackinney und O. Tenner, J. Amer. chem. Soc. 70, 3588 (1948).

sehr nahe beieinander, so daß ihre Trennung nur durch besondere Maßnahmen erreicht werden kann. Es wurde daher von jedem der in Frage kommenden Stoffe die Abhängigkeit des Halbwellenpotentials und der Stufenhöhe von Konzentration, Temperatur und Quecksilberdruck bestimmt, zum Teil auch in verschiedenen Grundlösungen. Bei ver-

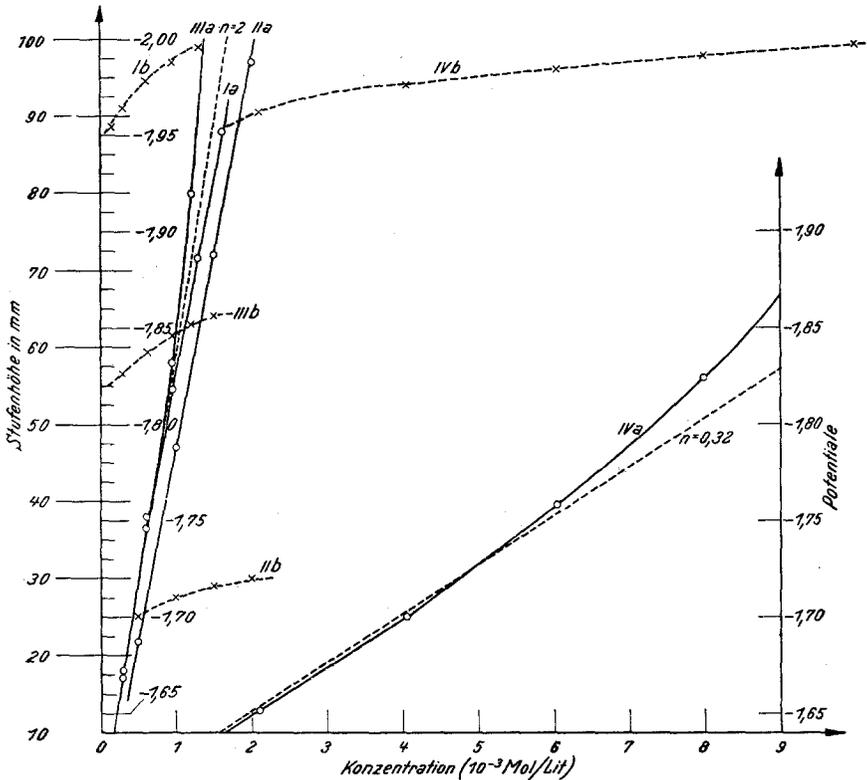


Abb. 1. Stufenhöhe (a) und Halbwellenpotential (b) von Acetol (I), Dioxyaceton (II), Methylglyoxal (III) und Milchsäurealdehyd (IV) als Funktion der Konzentration (10^{-3} Mol/l); Lösung neutral und ungepuffert, $E/50$, 20°C , $10\text{ ccm } n/20$, $\text{N}(\text{CH}_3)_4\text{Br}$ als Grundlösung. $1\text{ mm Stufenhöhe} = 2 \cdot 10^{-7}\text{ A}$.

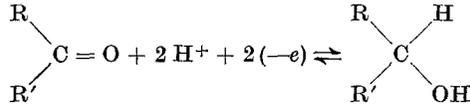
(- - - - -) = Stufenhöhe, berechnet für $n = 0,32$ und $n = 2$ (siehe S. 1007).

schiedenen Stoffen wurden auch noch andere charakteristische Größen ermittelt (z. B. die Temperaturhysterese des Glycerinaldehyds) (Abb. 1 bis 11).

II. Zur Polarographie von Einzelstoffen der untersuchten Gruppe.

Zum Verständnis des Nachfolgenden sind zu der als bekannt vorausgesetzten Theorie polarographischer Stufen (Stackelberg, l. c.) einige besonders für organische Stoffe geltende Zusätze nötig.

Im Bereiche der *Überspannung* des Wasserstoffes am Quecksilber können organische Stoffe an der Tropfelektrode reduziert werden. Für die Carbonylgruppe nimmt man die Gleichung



mit wenigen Ausnahmen als gültig an. Die elektrochemische Reversibilität im Sinne der Gleichung ist aber nur in wenigen Fällen (z. B. Chinone)

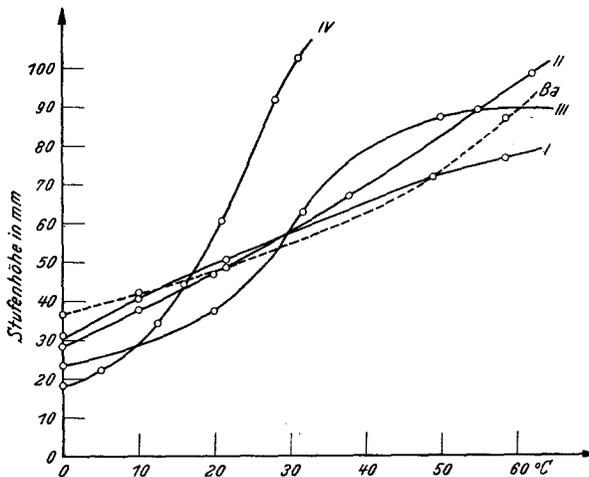


Abb. 2. Stufenhöhe als Funktion der Temperatur.

- I. Acetol ($c = 0,81 \cdot 10^{-3}$ Mol/l);
 II. Dioxyacetone ($c = 2 \cdot 10^{-3}$ Mol/l);
 III. Methylglyoxal ($c = 0,62 \cdot 10^{-3}$ Mol/l);
 IV. Milchsäurealdehyd ($c = 5,52 \cdot 10^{-3}$ Mol/l), alle gelöst in 10 cem $n/20$ $\text{N}(\text{CH}_3)_4\text{Br}$.
 Lösungen neutral und ungepuffert, $E/50$, 1 mm Stufenhöhe = $2 \cdot 10^{-7}$ A.

gegeben. Sonst verläuft die Reaktion an der Tropfelektrode nur nach rechts; hierbei werden irreversible Stufen ausgebildet, deren Form bei Ausschaltung allfälliger Grenzflächenstörungen (Maxima, Hautbildung am Quecksilber) der der reversiblen Stufe entspricht, deren Steilheit — ohne Rücksicht auf den Zellwiderstand — aber bis zu fünfmal geringer ausfällt.

Die Abhängigkeit der H. W. Pot. vom pH der Lösung gehorcht in wenigen Fällen der an reversiblen Stoffen (*Stackelberg*, S. 307) gefundenen Abhängigkeit:

$$d_{E^{1/2}}/d_{\text{pH}} = -n \cdot 0,029 \text{ mV.} \quad (1)$$

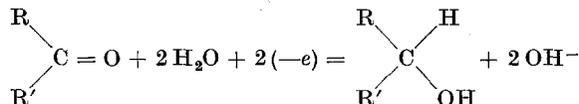
(n = Zahl der bei Reduktion aufgenommenen H-Atome pro Molekül.)

Wenn keine Doppelstufen auftreten, so liegt dieser Diff.-Quotient meist nahe den nach (1) berechneten Werten.

Da die Stufen der hier betrachteten Stoffe nahe an der H⁺-Stufe liegen, ist deren Ausschaltung wünschenswert. Dies ist möglich:

1. in *ungepuffert*, neutraler oder alkalischer Lösung,
2. *differentialpolarographisch* in gepuffertem Lösung.

Zu 1: In *ungepuffert* Lösung verlieren die Stufen ihre zentrosymmetrische Form bei verminderter Steilheit; die gegenseitige Abhängigkeit der Stufenlage und -höhe wird festgestellt. Ursache dieses Verhaltens ist der Anstieg des pH in der Kathodenumgebung während der Reduktion:



Berücksichtigt man, von neutraler Lösung ausgehend, diese pH-Verschiebung an einem Einzelstoff, so erhält man statt der normalen Gleichung:

$$E = E_{1/2} + 0,058/\nu \cdot \log(i_a - i)/i \tag{2}$$

die Gleichung:

$$E = E_{1/2(pH=7)} - 0,058/\nu \left[(n_r - n_0) (7 + \log(n_r - n_0) \sqrt{D_0/D_{\text{OH}^-}} \cdot C_0 \cdot i/i_a + 10^{-7}) - \log(i_a - i)/i \right] \tag{3}$$

[($n_r - n_0$) = Zahl der H-Atome pro Molekül bei der Reduktion; C_0 = analytische Konzentration des Depolarisators.]

Diese Gleichung wurde aus einer von *Stackelberg* allgemein gegebenen Beziehung² für die hier betrachteten Stoffe abgeleitet und am Acetol bewiesen³.

Dadurch fällt der größte Teil der Stufe in das alkalische Gebiet. Ist der Stufe dann noch ein OH⁻-katalysiertes Gleichgewicht vorgelagert, so erhöht sich die Stufe aus dem Nachlieferungsbeitrag. Dies kann zu schleifenden Übergängen in den Grenzstrom führen. In alkalischer Lösung ist diese Störung mit zunehmendem pH vermindert. Zur Vermessung ist dieser Bereich aber wegen der chemischen Veränderung, die viele dieser Stoffe dabei erleiden, unverwertbar.

Zu 2: In *Puffern* tritt die H⁺-Stufe — im Gegensatz zu ungepufferten Lösungen — bis zu pH = 8 infolge Nachlieferung aus dem Puffergemisch stets auf. Der Vorteil der zentrosymmetrischen Kurven, deren Höhe und Lage bei ausreichender Pufferkapazität von anderen Stufen unabhängig ist, wird hier erkauft durch die mangelhafte Auswertbarkeit von Stufen geringer Konzentration, wenn deren Halbwellenpotential

² Z. Elektrochem. 45, 466 (1939).

³ W. Stoll, Dissertation, Technische Hochschule Wien (1952).

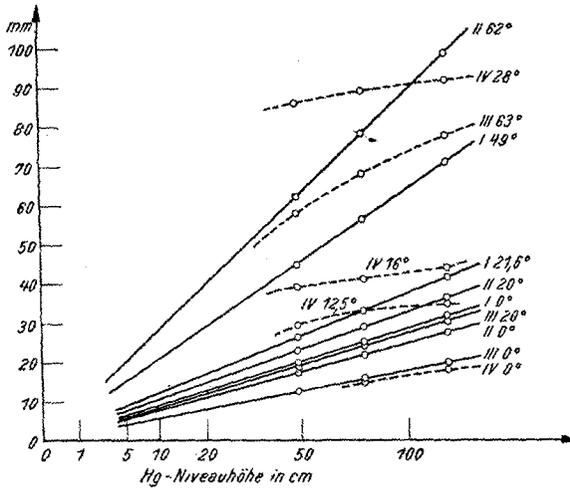


Abb. 3. Stufenhöhe als Funktion der Hg-Niveauhöhe. Lösungen von I, II und IV neutral und ungepuffert wie bei Abb. 2, Lösung III $c = 1,24 \cdot 10^{-3}$ Mol/l, pH 6,2, diff. gegen Puffer.

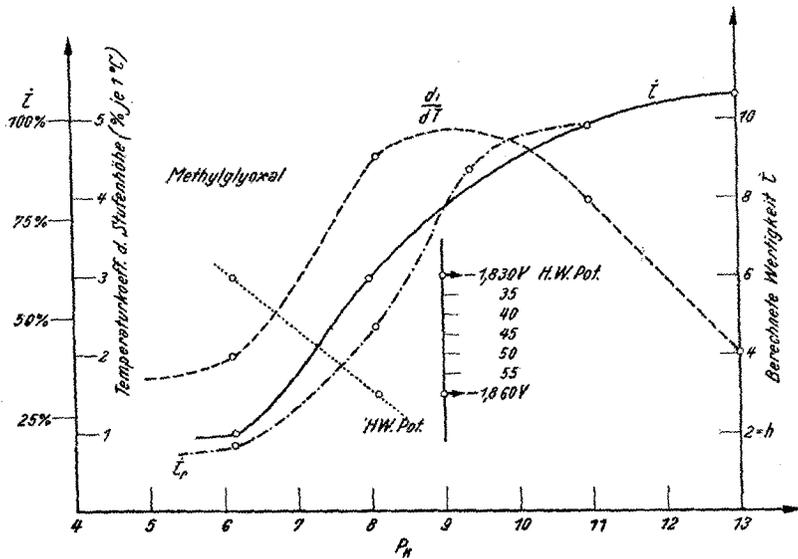


Abb. 4. Charakteristische Größen der Polarogramme von Methylglyoxal als Funktion des pH. i (—) aus der Stufenhöhe berechnete Wertigkeit (siehe S. 1007). i_r (---) Reaktionsanteil = Hg-Druck unabhängiger Anteil der Stufe bei 48 cm Hg-Niveau, in Prozent der Gesamtstufe. di/dT (····) Temperaturkoeffizient der Stufenhöhe in Prozent je Grad C bei 20° C. I. W. Pot. (— · — · —) Halbstufenpotential einer 10^{-3} m-Lösung (auf 0° C extrapoliert) gegen H^+ (Kalomelektrode) vermesssen, nach I. R. korrigiert.

nahe der H⁺-Stufe (pH = 7) liegt. Deshalb wurde *differentialpolarographisch* die H⁺-Stufe durch eine parallel geschaltete Meßzelle, die nur den Puffer enthielt, subtrahiert. Es ist dabei zu beachten, daß bei Stoffen, deren Halbwellenpotential negativer als das der H⁺-Stufe liegt, auch

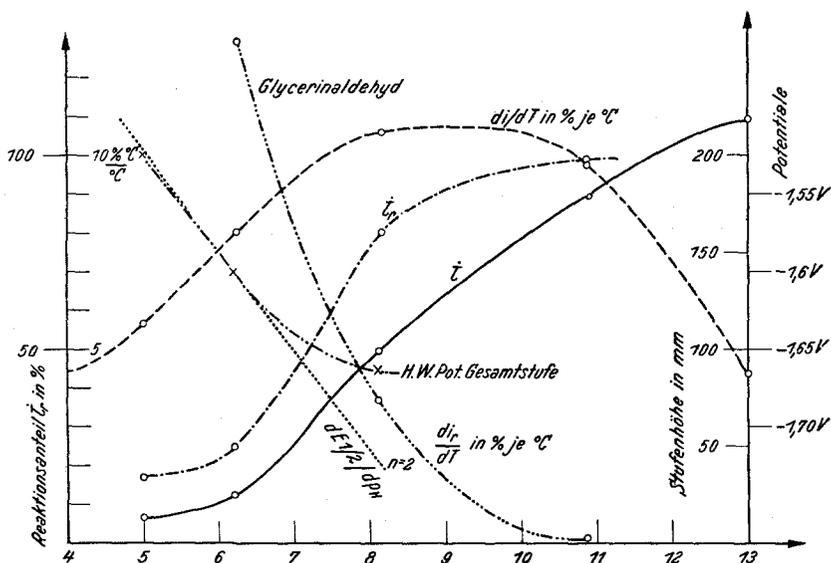
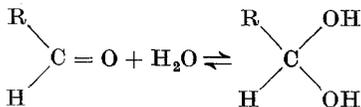


Abb. 5. Charakteristische Größen von Glycerinaldehyd als Funktion des pH.
i (—) Stufenhöhe einer $7,5 \cdot 10^{-3}$ m Lösung bei $E/50$ (i = mm St. H. $2 \cdot 10^{-7}$ A).
i_r (---) Reaktionsanteil, das heißt Hg-Höhen unabhängiger Anteil der Stufe bei 48 cm Niveau in Prozent der Gesamtstufe.
 di/dT (·····) Temperaturkoeffizient der Stufenhöhe bei 20° C in Prozent je Grad C.
 di_r/dT (·-·-·) Temperaturkoeffizient des Reaktionsanteiles der Stufe bei 20° in Prozent je Grad C.
H. W. Pot. (·····) Halbstufenpotential gegen TI⁺ und Ba⁺⁺-Stufe, nach i. R. korrigiert für $1 \cdot 10^{-3}$ m Lösung bei 0° C extrapoliert.
H. W. Pot. (·····), berechnet in Abhängigkeit von pH bei Zugrundelegung von $n = 2$ (siehe S. 1007).

in gepufferter Lösung keine gepufferte Reduktion stattfindet. Es tritt auch dann die bei 1 geschilderte unsymmetrische Stufenform auf.

Gut wasserlösliche *Aldehyde* liegen in verdünnter Lösung häufig zu einem beträchtlichen Teil in der Hydratform vor, nach:



Diese ist polarographisch unwirksam; die gemessene Stufenhöhe setzt sich aus dem Gleichgewichtsbetrag des freien Aldehyds und einem Betrag aus der Nachstellung des Gleichgewichtes in der Diffusionsschicht zusammen (vorgelagertes Gleichgewicht). Die Geschwindigkeit der Gleich-

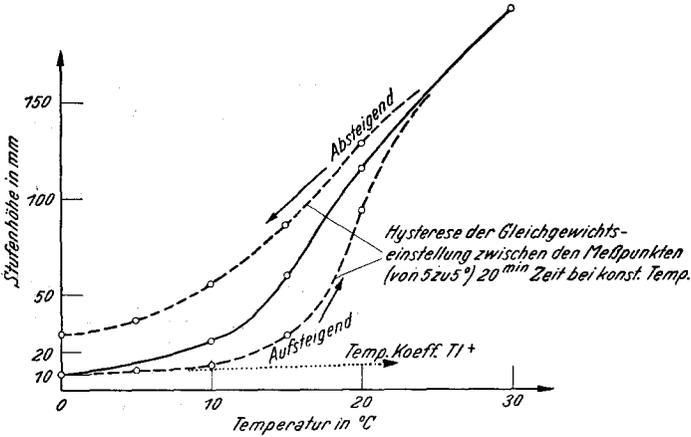


Abb. 6. Stufenhöhe des Glycerinaldehyds als Funktion der Temperatur. 0,2 cem 2%ig. Glycerinaldehyd in 10 cem $n/20$ $N(CH_3)_4Br$, neutral und ungepuffert (Kapillare II). Einstellzeit für das Gleichgewicht (—) bei 0° C: 2½ Stdn., bei 10° C: 1½ Stdn.

gewichtseinstellung und damit die Stufenhöhe nimmt mit zunehmender Temperatur und mit der Konzentration anwesender Katalysatoren (H^+ und OH^-) zu.

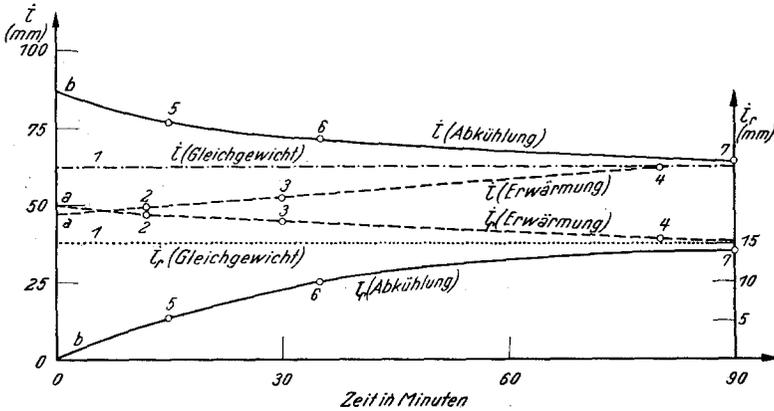


Abb. 7. Hysterese der Gleichgewichtseinstellung (Aldehyd, Hydrat) beim Glycerinaldehyd. Messung differentialpolarographisch, $E/20$, Faktor: 2,6, 1 mm St. H. = $2,6 \cdot 8 \cdot 10^{-8}$ A. 6,25 cem 0,1 m Tetramethylammonphosphatpuffer (pH = 6,2) mit 0,1% Polyvinylalkohol und 0,6 cem 2%ig. Glycerinaldehyd, 20° C. Vorbehandlung der Lösungen:
 a) 10 Stdn. auf 0° C, dann in 5 Min. auf 20° C, Messungen 2, 3, 4
 b) 1 Std. auf 45° C, dann in 5 Min. auf 20° C, Messungen 5, 6, 7.

Auf das Polarogramm hat das mehrere Auswirkungen: Man erhält bei normaler Temperatur eine kleinere als die berechnete Stufenhöhe mit einem großen Temperaturkoeffizienten; dagegen hat die Veränderung des Quecksilberdruckes an der Kapillare (Niveauhöhe) nur wenig Einfluß

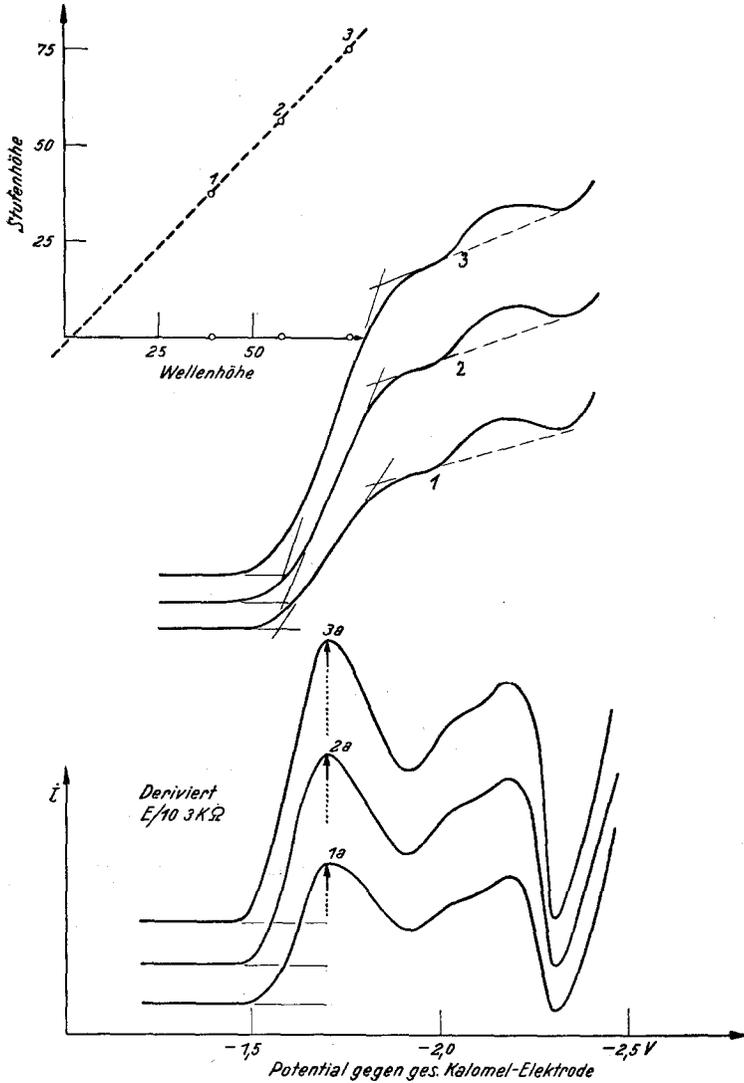


Abb. 8. Normale und derivierte Kurven von Dioxyaceton. Stufen- und Wellenhöhe als Funktion der Konzentration. 12 ccm $n/20$ $N(CH_3)_4Br$ + 0,2 ccm Polyvinylalkohol (2%ige wäbr. Lösung) und
 1. 0,2 ccm 0,1 m Dioxyaceton,
 2. 0,3 ccm 0,1 m Dioxyaceton,
 3. 0,4 ccm 0,1 m Dioxyaceton.

Kapillare I, 20° C. Normal: $E/100$ (1 mm Stufenhöhe = $4 \cdot 10^{-7}$ A). Deriviert: $E/10, 3 K\Omega$.

auf die Stufenhöhe, was man folgendermaßen versteht: Bei reiner Diffusion sinkt der Strom am Einzeltropfen unter Depolarisatorverbrauch mit der Zeit rasch ab und der gewöhnliche Diffusionsanteil ist

der Wurzel aus der Hg-Niveauhöhe direkt proportional. Erfolgt aber Nachlieferung aus einem Gleichgewicht, so ist gewöhnlich nicht die Verarmung am Gleichgewichtspartner (Hydrat), sondern die Nachlieferungsgeschwindigkeit strombestimmend und damit der Strom nur

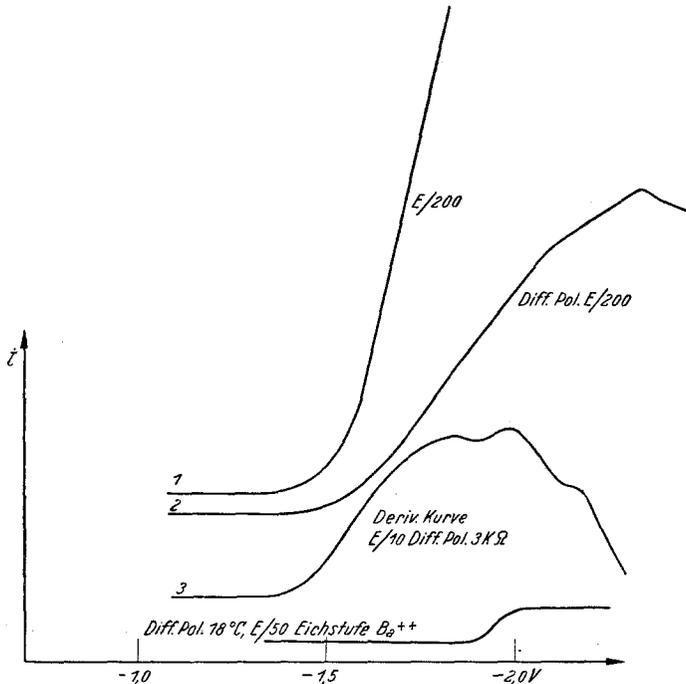


Abb. 9. Beispiel für die Trennschärfe der Differentialpolarographie und der Anwendung derivierter Kurven in differentialpolarographischer Anordnung. 1,0 ccm „0,1 m“ Milchsäurealdehyd + 6,25 ccm 0,1 m Tetramethylammonphosphatpuffer pH 8,1, 50° C, Kapillaren I (Meßlösung) und II (leerer Puffer)

1. einzelpolarographisch,
2. differentialpolarographisch,
3. deriviert-differentialpolarographisch.

der mittleren Tropfenoberfläche und nicht dem Quecksilberdruck proportional.

Bei gegebenem Potential ist für eine bestimmte Lösung die Tropfengröße an derselben Kapillare nur von der Grenzflächenspannung gegen die Lösung abhängig, so daß der Nachlieferungsanteil (Reaktionsanteil) in guter Näherung vom Quecksilberdruck unabhängig ist. Durch Messung bei zwei Niveaus gewinnt man daher Diffusions- und Reaktionsanteil zugleich (Abb. 3, i_r in Abb. 4, Abb. 5).

An *Ketonen* konnte keine merkliche Nachlieferung aus einem vorgelagerten Gleichgewicht festgestellt werden (Abb. 3).

Das Hydratgleichgewicht (der Aldehyde) ist stark temperaturabhängig und die Geschwindigkeit seiner Einstellung kann verschieden sein. Beim Glycerinaldehyd konnte *erstmalig* beobachtet werden, daß die Einstellung des Gleichgewichtes stark hinter der Anpassung der Meßzelle an die Versuchstemperatur nachhinkt (Hysterese der gemessenen Stufenhöhe) (Abb. 6, auch Abb. 7).

III. Anwendung von derivierten Polarogrammen und der Differentialpolarographie an Stoffgemischen.

Die Differentiation der Kurven nach der Spannung³ hat den Zweck, die Stellen der größten Steilheit in den *derivierten Kurven* als *Maxima*

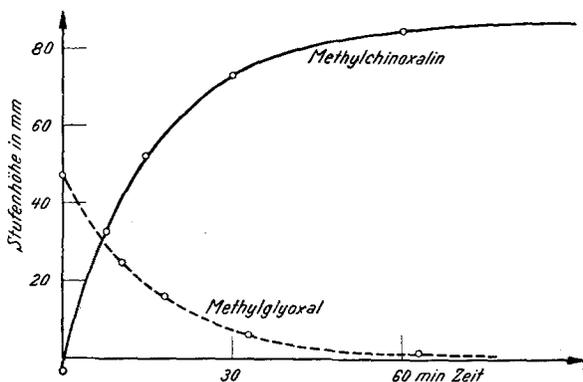


Abb. 10. Reaktion von Methylglyoxal mit o-Phenyldiamin bei 0° C. 10 ccm n/20 N(CH₃)₄Br + 75 mg o-Phenyldiamin + 0,2 ccm 0,06 m Methylglyoxal. E/50 (1 mm St. H. = 2 · 10⁻⁷ A), 0° C, Kapillare I.

erscheinen zu lassen und damit ihre Feststellung zu verschärfen. Bei unübersichtlichen Stufenfolgen wird so die Auswertung sehr erleichtert (Abb. 8, 13, 9, 14).

Um die gegenseitige geometrische Beeinflussung der Stufen bei *Gemischen* von neun wichtigen Zuckerabbauprodukten zu zeigen (alle Stufen dieser Stoffe liegen zwischen —1,1 bis —2,3 Volt; die isoliert bei —0,9 Volt liegende Diacetylstufe wurde nur bei der Chinoxalinbildung berücksichtigt), sind sie in Abb. 13 etwas schematisiert als *derivierte Kurven* dargestellt, wobei jede Scheitelhöhe einer 10⁻³ molaren Lösung des betreffenden Stoffes entspricht, für normale Polarogramme bei E/50. Vorher wurde an mehreren Beispielen (z. B. Methylglyoxal-Phenylglyoxal) festgestellt, daß eine gegenseitige *chemische* Beeinflussung der untersuchten Stoffe während des Polarographierens (Reduktion durch aktive Zwischenformen) *nicht* stattfindet.

Abb. 13 zeigt, daß folgende drei Zweistoffgemische ohne besondere Komplikationen noch *einzelpolarographisch* ausgewertet werden können: Brenztraubensäure-Acetol, Brenztraubensäure-Milchsäurealdehyd, Brenztraubensäure-Methylglyoxal.

Dagegen ist einzelpolarographisch eine quantitative Auswertung in folgenden zwei Gemischen nicht mehr möglich: Brenztraubensäure-Dioxyaceton-Acetol und Dioxyaceton-Milchsäurealdehyd.

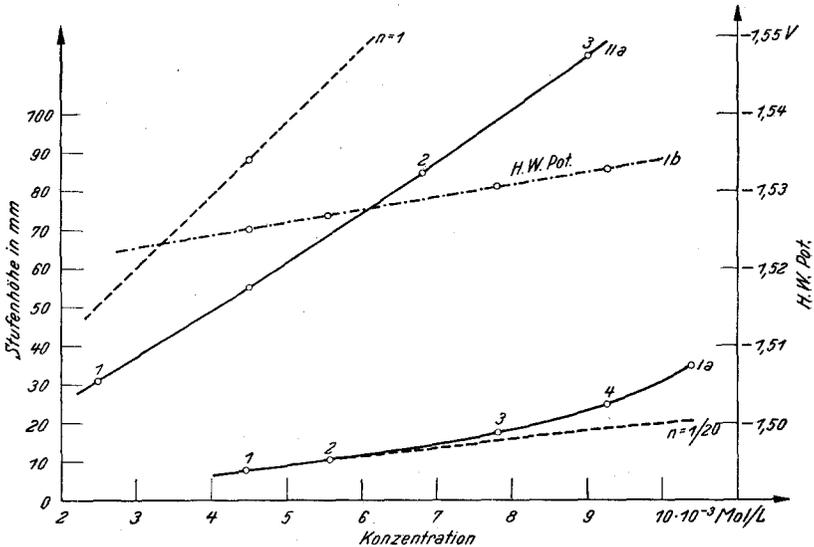


Abb. 11. Stufenhöhen (a) und Halbwellenpotentiale (b) von Glycerinaldehyd als Funktion der Konzentration. I Lösung neutral und ungepuffert, Grundlösung $n/20$ $N(\text{CH}_3)_4\text{Br}$; II Lösung alkalisch, Grundlösung $n/10$ $N(\text{CH}_3)_4\text{OH}$. (-----) Stufenhöhe, berechnet für $n = 2$ (siehe S. 1007). 0°C , $E/50$, $1\text{ mm St. H.} = 2 \cdot 10^{-7}\text{ A}$.

Etwas weiter kommt man mit der *Differentialpolarographie*. Man arbeitet zur quantitativen Erfassung mit $0,1\text{ m}$ Tetramethylammoniumborat-Puffer. Auswertbar sind: Brenztraubensäure-Dioxyaceton, Dioxyaceton-Acetol, Dioxyaceton-Milchsäurealdehyd.

IV. Methodische Bemerkungen.

A. Zur *einzelpolarographischen* Messung einer Mischung wird die Lösung zunächst ungepuffert genau neutralisiert und O_2 -frei (letzteres gilt natürlich für alle Messungen!) gemessen. Dann wird der Puffer zugegeben und in die Vergleichslösung wird, zusammen mit dem Puffer, 5% (relativ) weniger von dem Stoff mit dem *positiveren* H. W. Pot. zugegeben. Eine erneute Messung muß bei richtiger Wahl die erste Stufe bis nahe an die Nulllinie, aber nicht zu negativen Werten vermindert haben; hierauf wird auch die zweite Stufe kompensiert. Die ganze Kurve verläuft nun nahe der Nulllinie, aber nur im Idealfall gibt sie die beiden auf 5% der ursprünglichen Höhe

verminderten Stufen genau wieder. Die nächste (4.) Messung erfolgt mit Gefäßvertauschung, worauf ein zur vorigen Kurve etwa spiegelbildlicher Verlauf auftreten soll. Ist dies nicht der Fall, so muß nach gründlicher Mischung der Proben die Symmetrie des Systems an der entstehenden Nulllinie geprüft werden. Dies fordert oft viel Geduld, da kleinste Unstimmigkeiten, Verunreinigungen oder Beladungen der Bodenelektrode sowie der Lösung die ganze Messung verhindern können.

Enthält eine der beiden Lösungen, z. B. die Probe, noch Stoffe, deren Natur man nicht genau kennt, die aber bei positiveren Potentialen als dem der fraglichen Substanz in der Probe wirksam werden, so kann dies z. B. mit Chinon, weniger gut mit Ti^+ kompensiert werden, worauf man dann im eigentlichen Meßbereich Störungen vermeidet. Man läßt dazu mit einer Einstellung auf den Fußpunkt des ersten, zu erwartenden bekannten Stoffes, z. B. — 1 Volt für Brenztraubensäure, solange unter Stickstoffdurchleiten Chinonlösung zufließen, bis die Nulllage des Galvanometers erreicht ist, und mißt von diesem Punkt an ungestört.

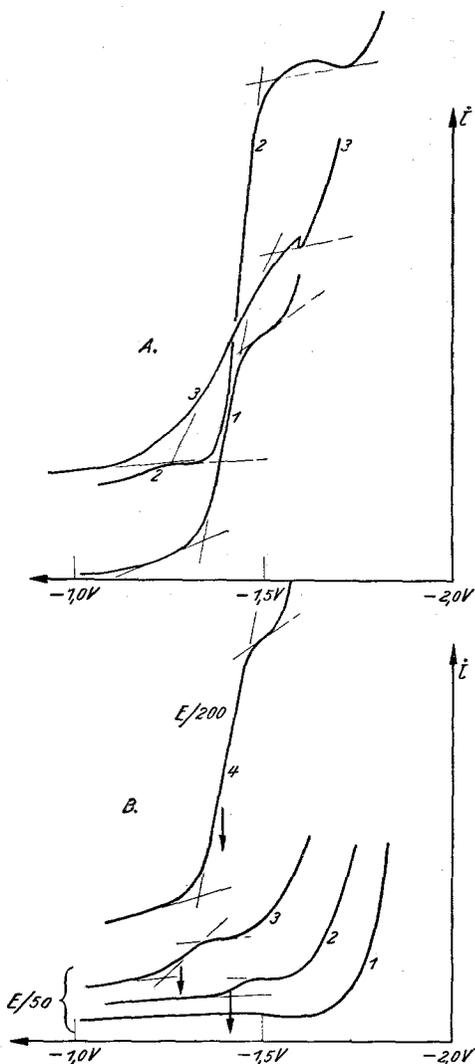


Abb. 12. Versuche mit NH_3 -Puffer (pH = 9,3) als Grundlösung.

A. Aldehyde und Dioxyacetone:

Grundlösung: 4,8 ccm H_2O + 1,2 ccm 5 m Puffer (pH 9,3).

1. Dioxyacetone, $c = 2,5 \cdot 10^{-3}$ Mol/l, 160 Min. Halbwertszeit;
2. Glycerinaldehyd, $c = 6,46 \cdot 10^{-3}$ Mol/l, 22 Min. Halbwertszeit;
3. Methylglyoxal, $c = 1,04 \cdot 10^{-3}$ Mol/l, 34 Min. Halbwertszeit.

0°C , $E/50$ (1 mm St. H. = $2 \cdot 10^{-7}$ A), Kapillare II, Hg-Niveau 123 cm. Potential gegen Bodenquecksilber gemessen.

B. Ketone:

1. Grundlösung wie bei A, hierin wurden zu je $1 \cdot 10^{-2}$ m gelöst;
2. Aceton ($E/50$);
3. Acetol ($E/50$);
4. Dioxyacetone ($E/200$).

Sonst wie bei A.

B. Beim Vorliegen *sehr kleiner* Mengen eines Stoffes neben großen Mengen eines anderen wendet man besser *derivierte Kurven* an (siehe oben).

Es gelingt damit, folgende Gemische qualitativ und annähernd (mit ± 10 bis 15% Relativfehler bei großem Konzentrationsunterschied) quantitativ zu bestimmen:

Methylglyoxal-Acetol (1 : 50 bis 1 : 1);

Dioxyaceton-Methylglyoxal (1 : 10 bis 3 : 1);

Methylglyoxal-Milchsäurealdehyd (1 : 50 bis 1 : 1).

Bei Messungen an Milchsäurealdehyd in einem Puffer pH = 8,1 konnte als Verunreinigung Methylglyoxal neben wenig Dioxyaceton nachgewiesen werden (Abb. 9).

C. Auch durch Messung der *Stufenhöhe bei verschiedenen Temperaturen*, z. B. 0°, 30° und wieder 0° C, kann eine Trennung schwer trennbarer Gemische erwirkt werden. Wie die Einzelaufnahmen gezeigt haben, ist der Temperaturkoeffizient bei den Ketonen gering, ähnlich dem anorganischer Ionen, während er bei Aldehyden bis zu 10% pro 1° C betragen kann (Abb. 2, 4, 5, 6). Liegen alle 9 Stoffe vor, so sind bei der ersten Messung bei 0° C nur Methylglyoxal, Dioxyaceton, Brenztraubensäure und Acetol zu finden, bei 30° C nur Glycerinaldehyd und Milchsäurealdehyd. Nach raschem Abkühlen bleibt die Glycerinaldehydstufe infolge ihrer starken Hysterese noch zirka 2 Stdn. lang bestehen (Abb. 6, 7). Auf Grund von drei solchen Messungen kann der Glycerinaldehyd auf 3 bis 5 Relativprozent genau gemessen werden.

D. Auch die Messung der *Stufenhöhe bei verschiedenen Quecksilber-niveaus* führt zu einer Unterscheidung zwischen Aldehyden und Ketonen. Wie aus den Einzelmessungen hervorgeht (Abb. 3, 4, 5), hängen die Stufenhöhen bei Aldehyden von der Niveauhöhe nur wenig ab, wodurch deren Kurven von denen der Ketone unterschieden werden können. Diese Meßmethode ist auch differentialpolarographisch anwendbar, womit selbst bei sonst so schwer unterscheidbaren Stoffen, wie Glycerinaldehyd und Dioxyaceton, ein Erfolg erzielt wird. Die Methode ist auch zur Trennung von Milchsäurealdehyd und Acetol sowie mit geringerer Genauigkeit bei pH > 7 für Methylglyoxal und Acetol anwendbar.

E. *Chemische Vorbehandlung* ermöglicht weitere Aufgliederungen. So kann man die Aldehyde Methylglyoxal, Milchsäurealdehyd, Glycerinaldehyd durch alkalische Vorbehandlung polarographisch unwirksam machen, z. B. durch 10 Min. langes Erwärmen der Lösung, die 0,1 m an Tetramethylammoniumhydroxyd sein soll, auf 70°. Die Differenz gegenüber einer rasch bei 0° C vorgenommenen Messung ergibt die oben genannten Stoffe. Zur Schonung des anwesenden Dioxyacetons läßt man die Stoffe besser 1 Std. bei Raumtemperatur stehen.

Verwendet man an Stelle einer alkalischen Grundlösung zur Messung einen $\text{NH}_3\text{-(NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Puffer mit pH = 9,3, der dieselbe zerstörende

Wirkung auf die drei genannten Aldehyde hat, so tritt dabei eine Reststufe auf, die auch für Dioxyaceton relativ beständig ist⁴. Da dieses im Vergleich zu Acetol eine viel höhere Stufe ergibt, ist es in Mischungen (auch wegen des Unterschiedes des H. W. Pot.) neben viel Acetol gut bestimmbar (Abb. 12).

Auch die *Kondensationsreaktion* von o-Phenylendiamin mit α -Dikarbonylverbindungen zu Chinoxalinen kann zur polarographisch-analytischen Bestimmung in der Zuckerreihe herangezogen werden. Beim Methylglyoxal ist diese Reaktion bei Raumtemperatur und einem entsprechenden Überschuß von o-Phenylendiamin nach 10 bis 15 Min. vollständig, so daß dann diese Chinoxalinstufe vermessen werden kann. Man nimmt zuerst die Gesamtkurve in ungepuffert oder auch in gepuffert neutraler Lösung auf, gibt zu je 5 ccm der Lösung 50 mg festes o-Phenylendiamin zu und mißt neuerdings. Wegen der Nähe der zweiten Sauerstoffstufe muß hier besonders sorgfältig entlüftet werden (Fehler ± 2 Relativprozent) (Abb. 10).

Die Schwierigkeit der Bestimmung von Gemischen mit *Glycerinaldehyd* ließ eine chemische Entfernung desselben nach einmaliger Vermessung unter Schonung der anderen gelösten Stoffe wünschenswert erscheinen. Da die Einwirkung von Alkali auch Milchsäurealdehyd und Methylglyoxal entfernt und Dioxyaceton angreift, ist dieser Vorgang nicht immer geeignet. Man kann aber die beiden *Triosen* Glycerinaldehyd und Dioxyaceton gemeinsam, und zwar nach saurer Umlagerung zu Methylglyoxal bestimmen. Ob die Reaktion quantitativ und eindeutig verläuft, ist noch nicht hinreichend geklärt; im Gemisch mit den übrigen Stoffen sind Störungen durchaus möglich. Durch Eichzusatz kommt man trotzdem auf folgende einfache Weise zu guten Meßergebnissen:

Die — möglichst unverdünnte — Probe wird mit einigen Tropfen konz. HCl versetzt, wobei man zur Ersparnis an dem zur Neutralisation nötigen Hydroxyd das Analysenvolumen wählt und unter Rückfluß 3 bis 4 Min. gelinde über einer Mikroflamme zum Sieden erhitzt. Nachher wird abgekühlt, in das Meßgefäß gespült und mit Tetramethylammoniumhydroxyd nahezu neutralisiert. Nach Zusatz von o-Phenylendiamin und gründlicher Entlüftung wird die Chinoxalinstufe gemessen. Behandelt man gleichlaufend eine zweite Probe unter Zugabe einer kleinen bekannten Glycerinaldehydmenge (etwa 10 bis 50% der vorher ermittelten) und mißt dort genau so, so kann man die Triosen mit $\pm 4\%$ rel. erfassen. Acetol und Brenztraubensäure, ebenso schon vorhandenes Methylglyoxal, werden dabei nicht zerstört; die Beständigkeit von reinem Milchsäurealdehyd unter gleichen Bedingungen ist noch unbekannt.

V. Trennungsgang für die neun Stoffe der Abb. 13.

Allgemeines. Aus dem dargelegten Verhalten der Einzelstoffe bei physikalischen und chemischen Änderungen der polarographischen Meß-

⁴ P. Zumann, Nature (London) 165, 485 (1950).

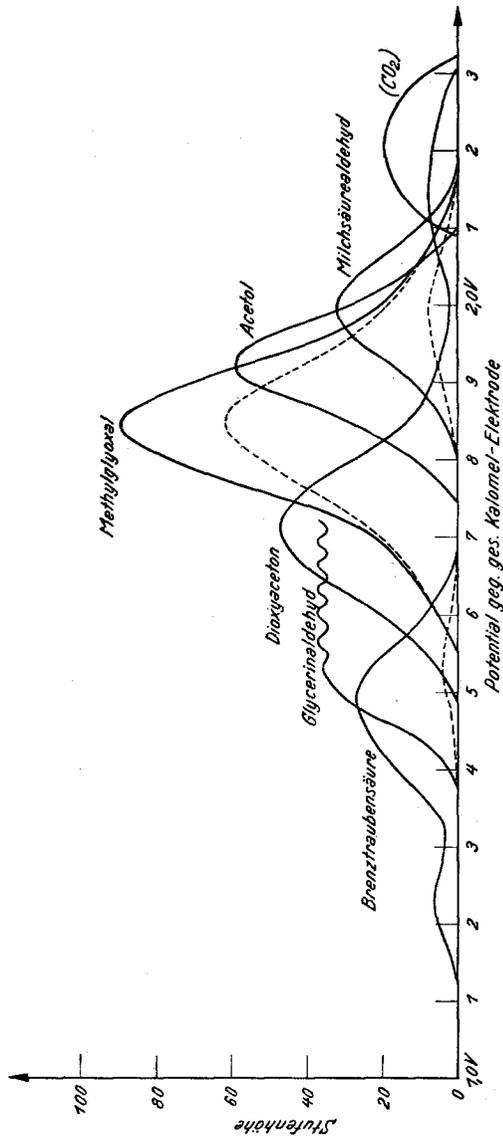


Abb. 13. Übersicht über die gegenseitige Stufenbeeinflussung in ungepuffert, neutraler $N(OH)_3/Br$ -Lösung. Stufenhöhe der Einzelstufe bei $E/50$ (1 mm = 2 · 10⁻⁷ A), 20° C, Kapillare I, 1 · 10⁻³ molare Lösung. (-----) = Stufenhöhe ohne den Einfluß kathodischen Alkalis aus positiverer Stufe. (.....) = Darstellung der Stufen in *derivierter* Form, aber mit wahrer St. H.

bedingungen läßt sich ein *Trennungsgang* ableiten, der unter Berücksichtigung der meisten, beim Zuckerabbau entstehenden Spaltprodukte eine qualitative und quantitative Trennung der Bestandteile zuläßt. Es liegt in der Natur der polarographischen Bestimmungen, daß qualitative und quantitative Befunde im allgemeinen aus derselben Kurve abgelesen werden. Hier ist jedoch auch die *indirekte* Methode (Schluß aus der

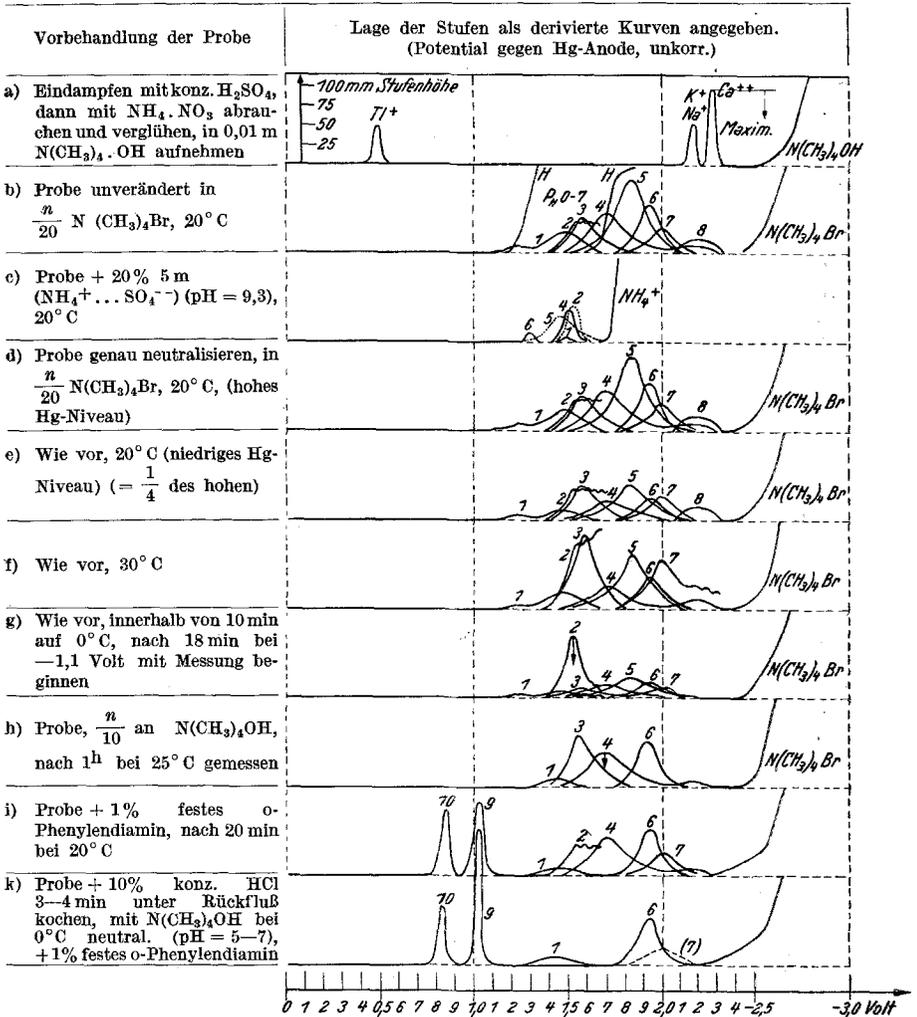


Abb. 14. Analysenschema. Stufenhöhe, angegeben für $1 \cdot 10^{-3}$ molare Lösungen, $E/50$, Kapillare I bei Meßtemperatur.

- Erläuterung:
- | | |
|-----------------------|--------------------------------------|
| 1. Brenztraubensäure, | 7. Milchsäurealdehyd, |
| 2. Glycerinaldehyd, | 8. Kohlendioxyd, gelöst, |
| 3. Formaldehyd, | 9. Methylglyoxal + o-Phenylendiamin, |
| 4. Dioxyaceton, | 10. Diacetyl + o-Phenylendiamin, |
| 5. Methylglyoxal, | 11. Aceton. |
| 6. Acetol, | |

Differenz zweier Messungen) angewendet worden, da die sonst erreichbare Trennschärfe zur Zergliederung der entstehenden Stufenfolge nicht ausreicht. Es ist daher nicht möglich, bei Vielstoffgemischen auf Grund eines Polarogramms endgültige Schlüsse zu ziehen, sondern es müssen

je nach der Natur der Mischung der vorhandenen Stoffe mehrere Aufnahmen unter veränderten Bedingungen herangezogen werden.

Der Trennungsgang nimmt auf den sehr ungünstigen Fall Rücksicht, daß *alle* betrachteten Stoffe in *gleicher* molarer Konzentration vorliegen. Ein solches 9-Stoff-Gemisch tritt sicher nicht häufig auf, so daß in der gewöhnlichen analytischen Praxis nach den Ergebnissen einer Übersichtsaufnahme die Trennung entsprechend vereinfacht werden kann.

Die Besprechung des Analysenganges erfolgt gleichlaufend mit dem geeigneten Übersichtsschema (Abb. 14). Darin ist zu jeder Vorbehandlung die entsprechende, für jeden Einzelstoff zu erwartende Kurve dargestellt. Um dabei die eintretende Störung durch Nachbarstufen gleich durch Addition der derivierten Beträge bestimmen zu können, wurde die übersichtlichere Darstellung der derivierten Kurven gewählt. Da man im normalen Falle jedoch die gewöhnlichen Stufen aufnimmt, ist der Randmaßstab hier so gewählt, daß er die *Stufenhöhe* — und nicht die weniger benötigte und leicht erreichbare Scheitelhöhe — der Stufen unter festgelegten Meßbedingungen (Kapillare, Empfindlichkeit) angibt. Auf die gegenseitige Beeinflussung der Stufenhöhe durch pH-Änderung der Kathodengrenzschicht wurde nur insofern Rücksicht genommen, als der höchste in ungepufferter Lösung beobachtete Wert im Diagramm Verwendung fand.

Vor jeder weiteren Messung ist es zweckmäßig, festzustellen, ob sich außer den organischen noch polarographisch wirksame, *anorganische* Stoffe im Gemisch befinden (siehe a, Abb. 14). Dazu werden die organischen Stoffe oxydativ zerstört und der Rückstand in Tetramethylammoniumhydroxyd vermessen.

Für eine erste *Übersichtsaufnahme* (b, Abb. 14) wird zweckmäßig wenigstens mit pH-Papier das pH der Lösung geprüft, da für $\text{pH} < 2$ keine der gesuchten Stufen, sondern nur die H^+ -Stufe auftritt. Die Messung erfolgt nach genauer Neutralisation.

Wird trotz Neutralisation nahe an $\text{pH} 7$ ab $-1,5$ V ein Linearanstieg verzeichnet, so liegt viel *Glycerinaldehyd* vor. Mit Berücksichtigung der Temperaturabhängigkeit der Stufenhöhe wird die Messung bei 0° wiederholt. Bei entsprechend raschem Abkühlen kann der Glycerinaldehyd durch Wiederholung der Messung im fraglichen Bereich nach 20 Min. an seiner Gleichgewichtshysterese erkannt werden.

Das besprochene 9-Stoff-Gemisch liefert im Bereich von $-1,5$ bis -2 V natürlich keine regelmäßige Stufenfolge; die vielfachen Überlagerungen bewirken vielmehr einen mäßig steilen Anstieg mit flachen Knicken, wobei schon alle zu erwartenden H. W. Pot. in ihrer richtigen Lage zueinander vorliegen.

Bei Aufnahme in *Ammoniakpuffern* (c, Abb. 14) tritt Formaldehyd nicht und Brenztraubensäure nur bei sehr großen Konzentrationen in

Erscheinung. Man erkennt *Glycerinaldehyd* und *Methylglyoxal* an einer raschen Höhenabnahme ihrer Stufen (strichliert); Dioxyaceton an einer recht beständigen normalen Stufe und Acetol sowie Aceton (hier 5mal so groß gezeichnet) an der vergleichsweise recht unbedeutenden Stufe.

Durch Variation des Hg-Niveaus, das heißt Ausmessen des Reaktionsanteiles in der sorgfältig neutralisierten Lösung für die einzelnen Stufenabschnitte (d und e, Abb. 14), kann das Gleichbleiben der Stufenhöhe beim Glycerinaldehyd, Formaldehyd und Milchsäurealdehyd (bei Verminderung der anderen Stufen auf die Hälfte) ausgemessen werden. Für eine gute analytische Auswertung haben wir Hg-Niveaus von 35 cm als unteres und 140 cm als oberes Niveau günstig gefunden ($\sqrt{140} : \sqrt{35} = 2 : 1$).

Bei niedrigem Niveau kann gleich der für die Unterscheidung der Aldehyde von den Ketonen charakteristische Temperaturkoeffizient ausgenützt werden (f, Abb. 14), da in der Wärme die durch die Niveauverminderung ohnehin schon zurückgedrängten Ketone relativ noch kleinere Stufen ergeben (in Abwesenheit größerer Mengen von Glycerinaldehyd kann zur Verstärkung des Unterschiedes auch bei Temperaturen bis 45° C gemessen werden).

Wie schon bei der Übersichtsmessung a angedeutet, kann hierauf die Hysterese der Gleichgewichtseinstellung des Glycerinaldehyds bei 0° C besonders gut gemessen werden (g, Abb. 14), da jetzt alle anderen Werte gleich klein neben dem des Glycerinaldehyds erscheinen.

Unter den angegebenen günstigen Bedingungen ist beim alkalischen Abbau mit Tetramethylammoniumhydroxyd nur mit einem geringen Zerfall des Dioxyacetons zu rechnen (6 bis 10%), so daß aus der Differenz gegen die Messung in neutraler Lösung unter gleichen Bedingungen (h, Abb. 14) zunächst der Glycerinaldehyd, nachfolgend Dioxyaceton und Acetol aus der Kurve bestimmt werden können. Bei Anwesenheit von viel Formaldehyd kann zur Unterdrückung der durch Alkali stark vergrößerten Stufe mit HClO_4 wieder auf schwach alkalisch gestellt werden. Der Formaldehyd kann aber auch durch Dimedonfällung aus dem Gemisch entfernt werden⁵.

Durch Zusatz von festem o-Phenylendiamin und Verrühren durch N_2 -Einblasen kann nach 20 Min. mit der Messung der zu den positiven Chinoxalinstufen verschobenen Stufen des Methylglyoxals und des Diacetyls begonnen werden (i, Abb. 14).

Kleine Mengen Formaldehyd werden vom Diamin unwirksam abgebunden. Die Anwesenheit des Diamins hat nur den Nachteil, daß infolge einer Verunreinigung oder auch katalytischer Wasserstoffabscheidung schon vor dem Endanstieg ein schleifender Stromanstieg einsetzt, der den Grenzstrom

⁵ St. Wawzonek, Organic Polarography, Anal. Chem. 22, 33 (1950).

des Acetols bei sehr kleinen Mengen des letzteren etwas verzerrt. Zur Messung darf mit Rücksicht auf die Zersetzlichkeit des Amins nicht länger als 2 bis 3 Stdn. nach dessen Zusatz gewartet werden; liegen größere Mengen Methylglyoxal vor, so ist das Abkühlen auf 0° zu vermeiden, da sonst unter Stufenverminderung Chinoxalin in schwarzbraunen Nadelchen und Büscheln im Meßgefäß auskristallisieren kann.

Die Variante der Chinoxalinfällung, in der die Triosen durch Erhitzen mit Salzsäure in Methylglyoxal übergeführt werden (k, Abb. 14), hat den Sinn, die anfänglich schwierig erschienene Ausmessung der Hysterese der Glycerinaldehydstufe zu umgehen; gleichzeitig kann so die Summe der Triosen direkt bestimmt werden. Nach den gewonnenen Erfahrungen verläuft die Reaktion mit HCl leider nicht quantitativ.

Als endgültige Kontrolle für die Richtigkeit der Messung wird die gefundene Lösungszusammensetzung durch Mischung aus bekannten Lösungen hergestellt und die Probe differentialpolarographisch vermessen. Kleine Schwankungen müssen jedoch wegen des erheblichen, zur völligen Gleichgewichtseinstellung nötigen Zeitbedarfs hingenommen werden.

Der hier gegebene Trennungsgang zur qualitativen und quantitativen Erfassung der Zuckerabbauprodukte auf polarographischem Wege stellt einen ersten Versuch vor und erhebt noch keinen Anspruch auf Vollständigkeit und große Genauigkeit. Wenn er auch in vielen Fällen durch andere analytische Methoden ergänzt werden muß, um die gefundenen Resultate noch fester zu untermauern, hat sich bei unserer schon durchgeführten analytischen Erfassung eines Teiles der Zuckerabbauprodukte jedenfalls zwischen den polarographischen Methoden und den üblichen quantitativen Bestimmungsmethoden eine ausgezeichnete Übereinstimmung ergeben. Vielversprechend erscheint auch die Kombination papierchromatographischer und polarographischer Methoden, über die wir in einer späteren Veröffentlichung berichten werden.

Experimenteller Teil.

A. Methodik der Einzelmessungen³.

Verwendet wurde ein *Heyrovsky*-Polarograph, Modell Sargent M XII, der sowohl zur Aufnahme von derivierten Kurven mit Hilfe eines R—C-Gliedes und entsprechender Dämpfung, als auch zur differentialpolarographischen Messung ausgerüstet wurde (ähnlich der Apparatur nach *Semerano* und *Riccoboni*⁶).

Die verwendeten Kapillaren hatten folgende Konstanten:

m Nr. mgHg/sec.	t (sec.)	H Niveauhöhe in cm	$m^{2/3}t^{1/6} = k$	log k
I 5,0366	0,875	123,5	2,8736	0,458431
II 5,0827	0,844	120,0	2,8738	0,458453

(gemessen bei 20° C in $1,0 \cdot 10^{-3}$ n KCl ohne Dämpfer, gegen Boden-Hg kurzgeschlossen).

⁶ G. *Semerano* und L. *Riccoboni*, Gazz. chim. ital. **72**, 297 (1942).

Als Kation der verwendeten Grundlösungen und Puffer wurde ein *Tetraalkylammoniumion* verwendet. Die Reinigung der Salze wurde nach einem besonderen Verfahren vorgenommen. Als *Dämpfer* diente neben bekannten Substanzen erstmalig Polyvinylalkohol. Alle Messungen wurden in völliger *Abwesenheit* von *Luftsauerstoff* durchgeführt. Die Reinigung der Chemikalien erfolgte nach den bei der Polarographie üblichen Bedingungen. Als Bezugsnormale für die angegebenen Halbwellenpotentiale dienten die Stufen von *Thallium* und *Barium*⁷. Die in den Abbildungen angegebenen Wertigkeiten (*n*) wurden durch Vergleich der Stufenhöhen organischer Stoffe mit der TI-Stufe errechnet. Zur Abschätzung der Diffusionskonstanten der organischen Stoffe diente die Regel von *Oeholm*⁸ ($D \cdot M^{1/2} \sim 7$ bei 25° C), für Thallium wurde sie aus dem Literaturwert der Wanderungsgeschwindigkeit für verd. Lösungen, $D = 2,00 \cdot 10^{-5}$ $\mu\text{cm}/\text{sec.}$ bei 25° C errechnet^{3, 9}.

B. Darstellung der zur Polarographie verwendeten Präparate.

1. Methylglyoxal aus Aceton und Selenodioxyd¹⁰.
2. Dioxyaceton (III) aus Glycerin über α, α' -Glycerindichlorhydrin (I) und Dichloraceton (II).
 - I: Aus Glycerin¹¹.
 - II: Aus α, α' -Glycerindichlorhydrin mit Kaliumbichromat und Schwefelsäure¹².
 - III: Aus Dichloraceton durch Umsetzung mit KOH in der Kälte¹³.
3. d-Glycerinaldehyd (II) aus d-Mannit über 1,2,5,6-Diacetonmannit (I).
 - I: Aus d-Mannit durch Acetonieren¹⁴.
 - II: Aus 1,2,5,6-Diacetonmannit durch Behandeln mit Bleitetraacetat¹⁵.
4. Milchsäurealdehyd (III) aus Methylglyoxal (I) über Methylglyoxal-diäthylacetal (II).
 - I: Siehe 1.
 - II: Aus Methylglyoxal durch Acetalisieren mit Alkohol und Salzsäure¹⁶.
 - III: Aus Methylglyoxaldiäthylacetal durch Reduktion mit Natrium und absol. Alkohol¹⁶.
5. Acetol (II) aus Aceton über Chloraceton (I)¹⁷.
 - I: Aus Aceton durch Chlorieren¹⁷.
 - II: Aus Chloraceton durch Umsetzen mit Kaliumformiat¹⁸.
6. Diacetyl aus Methyläthylketon und Isoamylnitrit¹⁹.

⁷ S. M. Cantor und Q. P. Peniston, J. Amer. chem. Soc. **62**, 2113 (1940).

⁸ Z. physik. Chem. **50**, 309 (1905).

⁹ K. Bieber und G. Trümpler, siehe Stackelberg, I. c., E 194, b.

¹⁰ H. L. Riley, J. F. Morton und M. A. C. Friend, J. chem. Soc. London **1932**, 1875.

¹¹ J. B. Conant und O. R. Quail, Org. Syntheses **2**, 29 (1922).

¹² J. B. Conant und O. R. Quail, Org. Syntheses **2**, 13 (1922).

¹³ E. Waldmann und V. Prey, Mh. Chem. **82**, 861 (1951).

¹⁴ E. Baer, J. Amer. chem. Soc. **67**, 338 (1945).

¹⁵ H. O. L. Fischer und E. Baer, Helv. chim. Acta **19**, 524 (1936).

¹⁶ A. Wohl und M. Lange, Ber. dtsh. chem. Ges. **41**, 3599 (1908).

¹⁷ P. Fritsch, Ber. dtsh. chem. Ges. **26**, 597 (1893).

¹⁸ P. A. Levene und A. Walti, Org. Syntheses **10**, 1 (1930).

¹⁹ O. Diels und E. Stephan, Ber. dtsh. chem. Ges. **40**, 4338 (1908).

7. Brenztraubensäure durch Destillation von Weinsäure mit Kaliumbisulfat²⁰.

Zusammenfassung.

Die polarographische Bestimmung folgender Zuckerabbauprodukte (Glycerinaldehyd, Dioxyaceton, Methylglyoxal, Acetol, Brenztraubensäure und Milchsäurealdehyd) wird für die betreffenden Reinstoffe und für ihre Mischungen eingehend studiert, wobei über die Aufnahme normaler Polarogramme hinaus von derivierten Kurven, von der Differentialpolarographie sowie von den Einflüssen der Temperatur und des Hg-Niveaus auf die Stufenhöhe Gebrauch gemacht wird. Es wird ein systematischer Trennungsgang für neun wichtige Stoffe beschrieben, bei dem außer den genannten Mitteln auch noch gewisse chemische Vorgänge benützt werden.

²⁰ J. W. Hovart und W. A. Fraser, *Org. Syntheses* 4, 63 (1925).