

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für Arbeitsphysiologie, Berlin.)

Über eine quantitative colorimetrische Bestimmungsmethode des Methylglyoxals, Dioxyacetons und Glycerinaldehyds.

Von
Erich Baer.

Mit 3 Textabbildungen.

(Eingegangen am 27. Februar 1928.)

Das außerordentliche Interesse, welches die Arbeitsphysiologie am Muskelchemismus im allgemeinen und an dem Verhalten der Milchsäure im besonderen hat, ließ schon längst den Wunsch nach einer zuverlässigen, rasch arbeitenden und leicht zu handhabenden Methode zur Bestimmung der Milchsäure aufkommen. Vor einigen Jahren beschrieb Harrop¹ ein Verfahren, welches diese Erwartungen zu erfüllen schien. Es wurde in letzter Zeit von Mendel und Goldscheider² wesentlich verbessert, so daß es sich schon in vielen Laboratorien Eingang verschafft hat. Die Methode eignet sich zur quantitativen Bestimmung von kleinen Mengen Milchsäure in Blut und anderen biologischen Flüssigkeiten. Nach Beseitigung von Begleitsubstanzen (Eiweißstoffen und Kohlehydraten) durch aufeinanderfolgende Fällung mit *m*-Phosphorsäure sowie Kupfersulfat-Calciumhydroxyd wird die restierende Milchsäurelösung mit konz. Schwefelsäure und alkoholischer Veratrollösung versetzt. Aus der Intensität der auftretenden Rosafärbung durch Vergleich mit einem geeichten Keil kann dann die Menge der in der untersuchten Lösung vorhandenen Milchsäure bestimmt werden. Die Verfasser nehmen dabei an, daß beim Mischen der Milchsäure mit konzentrierter Schwefelsäure Acetaldehyd entsteht, welcher sich mit Veratrol zu der in schwefelsaurer Lösung rosa gefärbten Verbindung kondensiert.

Es ist nun von großer Bedeutung, ob auch andere Körper als Milchsäure einen ähnlichen Farbeffekt mit Veratrollösung geben. Im folgenden wird gezeigt werden, daß dies für Methylglyoxal, Dioxyaceton und Glycerinaldehyd (und höhere Zucker) in der Tat zutrifft. Damit erleidet aber die Mendel-Goldscheidersche Milchsäurebestimmungsmethode keinen Abbruch; denn alle die oben genannten Körper können nicht als Störungssubstanzen wirken, weil sie mit Ausnahme des Methyl-

¹ G. A. Harrop jr. (Chem. div., Med. dep. John Hopkins hosp. Baltimore), Proc. of the soc. f. exp. biol. a. med. New York **17**, Nr. 7, S. 162. 1920.

² B. Mendel und J. Goldscheider, Biol. Zentralbl. **164**, H. 1/3, S. 163—174. 1925.

glyoxals bei der Kupfersulfatkalkfällung entfernt werden. Das Vorkommen des Methylglyoxals im Blut oder anderen biologischen Flüssigkeiten ist aber unwahrscheinlich, weil es durch die im Organismus weitverbreitete Glyoxalase^{1,2,3} sehr schnell in Milchsäure verwandelt wird. Man kann also wohl zur Zeit sagen, daß bei vorschriftmäßiger Ausführung der Methode eine quantitative Erfassung der Milchsäure gewährleistet ist.

Andererseits wird es aber sehr häufig wünschenswert sein, auch die oben genannten Stoffe quantitativ zu ermitteln; besonders das Methylglyoxal spielt ja beim Muskelchemismus und Gärungsvorgang als Zwischenprodukt eine große Rolle. Der quantitative Nachweis des Methylglyoxals, Dioxyacetons und Glycerinaldehyds gelingt unschwer nach den für die Bestimmung der Oxyaldehyde bekannten Methoden, wenn sie in relativ größerer Menge vorliegen. Diese Methoden versagen aber, wenn es gilt, den Gehalt dieser drei genannten Körper in extrem verdünnten Lösungen zu bestimmen.

Es lag somit nahe, diese colorimetrische Bestimmungsmethode, deren Vorzüge in der Unabhängigkeit von besonderen Lichtquellen, geringem Apparatenaufwand, rascher und einfacher Ausführung besteht, und die dadurch für die analytische Praxis in einer Reihe mit den Titrier- und elektroanalytischen Schnellmethoden steht, auch auf die Bestimmung des Methylglyoxals, Dioxyacetons und Glycerinaldehyds auszudehnen. Es gelang für die drei genannten Körper zu zeigen, daß sie sich nach dieser Methode mit einer Genauigkeit bestimmen lassen, welche innerhalb der den colorimetrischen Methoden eigentümlichen Fehlergrenzen ($\pm 2\%$) liegt. Der Nachweis der in Rede stehenden Körper mit dieser Methode ist so fein, daß sich noch 0,02 mg von ihnen mit der angegebenen Genauigkeit bestimmen lassen.

Ferner wurden einige von *Denigès*⁴ angegebenen Kondensationsreaktionen des Dioxyacetons mit Resorcin, Thymol, α -Naphtol, Guajakol, Salicylsäure und Kodein, welche zu intensiv gefärbten Kondensationsprodukten führen, auf ihre Eignung zur quantitativen Bestimmung der drei in Frage stehenden Körper untersucht und gefunden, daß es in den untersuchten Fällen schwierig ist, mit den genannten Substanzen reine Farbtöne zu erzeugen und zu reproduzieren. Das Kodein, welches gestatten würde, noch geringere Mengen Dioxyaceton als mit Veratrol nachzuweisen, scheidet leider für die quantitative colorimetrische Bestimmung aus, da die grünlich gefärbte, schwefelsaure Lösung des Kondensationsproduktes nicht dem *Beerschen* Verdünnungsgesetz folgt.

¹ C. Neuberg, Biochem. Zeitschr. **49**, 502. 1913; **51**, 484. 1913.

² H. D. Dakin und H. W. Dudley, Journ. of biol. chem. **14**, 155 u. 423. 1913; **15**, 127 u. 463. 1913; **16**, 505. 1914.

³ P. A. Levene und G. M. Meyer, Journ. of biol. chem. **14**, 551. 1913.

⁴ *Denigès*, Cpt. rend. **148**, 172, 282, 422.

Das Prinzip der *Mendel-Goldscheiderschen* Methode, welcher ich mich zur Bestimmung des Methylglyoxals, Glycerinaldehyds und Dioxyacetons bediente, ist schon oben angegeben worden. Die Ausführung der Bestimmung ist für alle drei Substanzen die gleiche und wie folgt:

Die Lösung einer der 3 Substanzen wird, falls sie konzentrierter als 15 mg-% ist, durch Verdünnen auf eine Konzentration von 5—15 mg-% gebracht. Von dieser verdünnten Lösung werden in einem weiten Jenaer Reagensglas unter Eiskühlung 0,5 ccm tropfenweise mit genau 3 ccm Acidum sulfuricum conc. pro analysi acidi lactici (Kahlbaum) versetzt und genau 4 Minuten in einem stark-siedenden Wasserbade erhitzt.

Hierauf wird die Lösung sofort in Eis abgekühlt und nach 2 Minuten mit 0,1 ccm einer 0,125proz. Lösung von Veratrol in absolutem Alkohol versetzt. Die auftretende Rosafärbung, welche einen reinen Farbton besitzen muß, wird nach genau 20 Minuten im Autenrieth-Colorimeter abgelesen. Der zum Vergleich dienende Keil wird mit einer verdünnten alkoholischen Lösung von Carbofuchsin gefüllt, welcher ein Tropfen Organge G zugefügt ist.

Zur Eichung des Colorimeterkeils werden nur Lösungen der reinen Substanzen von genau bekanntem Gehalt verwendet, wobei es sich empfiehlt, die Substanzen wie folgt darzustellen:

Methylglyoxal¹: 5 g Dioxyaceton werden in einem Rundkolben mit kurzem breiten Hals mit ungefähr 15 g Phosphorperoxyd gut gemischt und im Vakuum destilliert. Als Vorlage dient ein langes Saugglas, das durch flüssige Luft gekühlt wird. Die Destillation geht nach kurzem Erwärmen mit freier Flamme von selber unter heftiger Reaktion zu Ende. Das übergehende gelbgrün gefärbte Methylglyoxal erstarrt zu einer glasigen Masse (Ausbeute 40—60% der Theorie), welche zur Reinigung nochmals im Vakuum destilliert wird. Das frisch bereitete gelbgrün gefärbte, leicht bewegliche Methylglyoxal ist unter spontaner Erwärmung und Entfärbung beliebig löslich in Wasser.

Das Dioxyaceton ist am leichtesten zugänglich durch Einwirkung von Sorbose-Bacterium auf Glycerin nach *Bertrand*². Es ist im festen Zustande dimolekular und geht in wässriger Lösung im Verlauf von einigen Stunden³ (schneller beim Erwärmen) in monomolekulares Dioxyaceton über. Zur Reinigung wird das käufliche Dioxyaceton (Oxantin, Meister, Lucius und Brüning) nach Auskochen mit Aceton im Hochvakuum destilliert⁴ und das monomolekulare Destillat mehrmals aus Alkohol umkrystallisiert.

Die Darstellung des Glycerinaldehyds, welche zeitraubend und umständlich ist, geschieht am besten nach *A. Wohl* und *Mylo*⁵ oder in der von *E. J. Witzemann*⁶ abgeänderten Form. Über die Darstellung ist bei diesen beiden Autoren nachzulesen. Der nach *Wohl* oder *Witzemann* dargestellte krystallisierte Glycerinaldehyd ist auf jeden Fall mehrmals mit absolutem Aceton auszukochen, wobei der Schmelzpunkt von 132 auf 145,5° steigt⁷.

¹ *H. O. L. Fischer* und *C. Taube*, Ber. d. chem. Ges. **57**, 1502. 1924.

² *Bertrand*, Ann. de chim. **8**, 3, 253. 1904.

³ *Bertrand*, Cpt. rend. **129**, 341. 1899.

⁴ *H. O. L. Fischer* und *H. Mildbrandt*, Ber. d. chem. Ges. **57**, H. 4. 1924.

⁵ *A. Wohl* und *Mylo*, Ber. d. chem. Ges. **45**, 2046. 1912.

⁶ *E. J. Witzemann*, Journ. of the Americ. chem. soc. **36**, 1766. 1914 (Chem. Zentralbl. **2**, 974. 1914).

⁷ *H. O. L. Fischer*, *C. Taube*, *E. Baer*, Ber. d. chem. Ges. **60**, 479. 1927.

Von jeder der drei genannten Substanzen wurden nun zwei Lösungen von verschiedenem Gehalt hergestellt, von welchen je eine Lösung zur Eichung des Keils diente, während aus der anderen durch Verdünnen eine Reihe von schwächeren Lösungen hergestellt wurde, in welchen mit Hilfe des nunmehr geeichten Keils der Gehalt an der betreffenden Substanz bestimmt wurde.

Die Brauchbarkeit dieser Methode zur Bestimmung der drei Aldehyde geht aus den folgenden Versuchsprotokollen hervor.

Methylglyoxal: Lösung I enthält 126,3 mg; Lösung II 305,2 mg Methylglyoxal in 100 ccm Wasser.

Eichung: Lösung I wird, wie in Tab. 1, Spalte 1 angegeben, verdünnt und von jeder Lösung die auftretende Rotfärbung nach Kondensation mit Veratrol im Autenrieth-Colorimeter bestimmt.

Tabelle 1.

Nr.	Verdünnung der Lösung 1	Skalenteil	mg-% Methylglyoxal der Lös. 1—6 berechnet aus der Einwaage
1	0,3 ccm Lös. I + 9,7 ccm H ₂ O	90,0	3,79
2	0,4 „ „ + 9,6 „ „	83,0	5,05
3	0,5 „ „ + 9,5 „ „	75,5	6,03
4	0,6 „ „ + 9,4 „ „	68,5	7,6
5	0,7 „ „ + 9,3 „ „	61,5	8,8
6	0,8 „ „ + 9,2 „ „	56,5	10,1

Die in Spalte 2 stehenden Zahlen geben die Skalenteile an, welche man findet, wenn man den Keil des Colorimeters so verschiebt, daß der Farbton des in dem Beobachtungsfenster erscheinenden Teils des Keils mit dem der untersuchten Lösung übereinstimmt. Bestimmung des Methylglyoxals in den durch Verdünnen aus Lösung n II hergestellten schwächeren Lösungen (Lösungen 1—4).

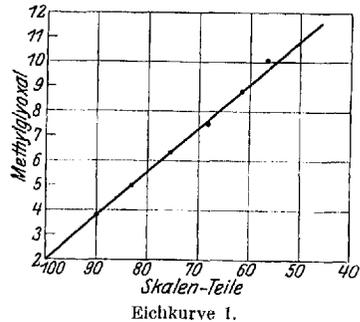


Tabelle 2.

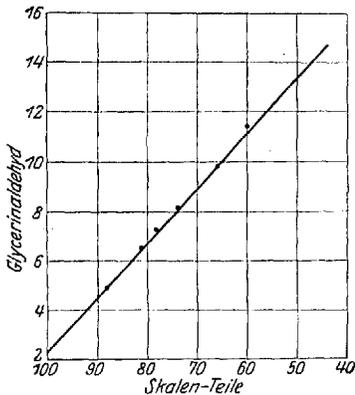
Nr.	Verdünnung der Lösung 2	Skalenteil	mg-% Methylglyoxal	
			berechnet	gefunden
1	0,15 ccm Lös. II + 9,85 ccm H ₂ O	81,5	4,60	4,75
2	0,25 „ „ + 9,75 „ „	68,5	7,63	7,60
3	0,35 „ „ + 9,65 „ „	51,5	10,68	10,60
4	0,45 „ „ + 9,55 „ „	36,0	13,70	13,40

Glycerinaldehyd: Lösung I enthält 162,8 mg, Lösung II 202,6 mg Glycerinaldehyd in 100 ccm Wasser. Vor der Bestimmung standen beide Lösungen 30 Minuten in siedendem Wasser.

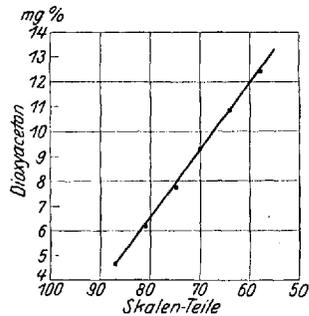
Eichung des Keils: Wie oben.

Tabelle 3.

Nr.	Verdünnung der Lösung 1	Skalenteil	mg-% Glycerinaldehyd berechnet aus der Einwage
1	0,30 ccm Lös. I + 9,70 ccm H ₂ O	88,5	4,88
2	0,40 „ „ + 9,60 „ „	81,0	6,51
3	0,45 „ „ + 9,55 „ „	78,0	7,32
4	0,50 „ „ + 9,50 „ „	74,0	8,14
5	0,60 „ „ + 9,40 „ „	66,0	9,80
6	0,70 „ „ + 9,30 „ „	60,0	11,40



Eichkurve 2.



Eichkurve 3.

Bestimmung des Glycerinaldehydgehaltes der Lösungen 1—5, welche durch Verdünnen der Lösung II hergestellt worden sind.

Tabelle 4.

Nr.	Verdünnung der Lösung 2	Skalenteil	mg-% Glycerinaldehyd	
			gefunden	berechnet
1	0,3 ccm Lös. II + 9,7 ccm H ₂ O	82,5	6,2	6,08
2	0,4 „ „ + 9,6 „ „	73,0	8,3	8,10
3	0,5 „ „ + 9,5 „ „	63,5	10,4	10,13
4	0,6 „ „ + 9,4 „ „	57,0	11,8	12,15
5	0,7 „ „ + 9,3 „ „	46,5	14,2	14,18

Dioxyaceton: Lösung I enthält 155,4 mg, Lösung II 141,1 mg Dioxyaceton in 100 ccm Wasser. Vor der Bestimmung standen beide Lösungen 30 Minuten in siedendem Wasser.

Eichung des Keils.

Tabelle 5.

Nr.	Verdünnung der Lösung 1	Skalenteil	mg-% Dioxyaceton berechnet aus der Binwage
1	0,3 ccm Lös. I + 9,7 ccm H ₂ O	87,0	4,66
2	0,4 „ „ + 9,6 „ „	81,5	6,22
3	0,5 „ „ + 9,5 „ „	75,0	7,77
4	0,6 „ „ + 9,4 „ „	70,0	9,32
5	0,7 „ „ + 9,3 „ „	64,0	10,87
6	0,8 „ „ + 9,2 „ „	58,0	12,43

(Siehe Eichkurve 3.)

Bestimmung des Dioxyacetons der Lösung I—5, welche durch Verdünnen der Lösung II hergestellt worden sind.

Tabelle 6.

Nr.	Verdünnung der Lösung 2	Skalenteil	mg-% Dioxyaceton	
			berechnet	gefunden
1	0,4 ccm Lös. II + 9,6 ccm H ₂ O	82,5	5,64	5,80
2	0,5 „ „ + 9,5 „ „	78,0	7,05	7,05
3	0,6 „ „ + 9,4 „ „	73,5	8,46	8,25
4	0,7 „ „ + 9,3 „ „	66,0	9,87	10,30
5	0,8 „ „ + 9,2 „ „	61,0	11,28	11,70

In den Eichkurven I, II und III sind zur Erleichterung der Berechnung des Methylglyoxals, Glycerinaldehyds und Dioxyacetons die zu den Skalenteilen des Autenrieth-Colorimeters gehörigen Konzentrationen der 3 Substanzen in Milligrammprozent angegeben.

Zusammenfassung.

Die Methode der Milchsäurebestimmung nach *Mendel-Goldscheider* wurde zur Bestimmung des Methylglyoxals, Dioxyacetons und Glycerinaldehyds angewendet mit dem Erfolg, daß sich die drei genannten Substanzen noch bis zu einer Konzentration bis zu 4 mg-% herab, oder absolut 0,02 mg mit ausreichender Genauigkeit quantitativ bestimmen lassen.