

ZUR STRUKTUR DER DEHYDROASCORBINSÄURE IN WÄSSRIGER LÖSUNG*†

KONRAD PFEILSTICKER, FRIEDHELM MARX UND MICHAEL BOCKISCH

Lehrstuhl für Lebensmittelwissenschaft der Universität Bonn,

Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, D 53 Bonn (W. Deutschland)

(Eingegangen am 30. Juni 1975; angenommen in revidierter Form am 22. September 1975)

ABSTRACT

On the basis of g.l.c., u.v., i.r., n.m.r. and m.s. data, dehydroascorbic acid obtained by oxydation of L-ascorbic acid in aqueous solution mainly exists as a bicyclic hydrated species, *i.e.* 3,6-anhydro-L-xylo-hexulono-1,4-lactone hydrate.

ZUSAMMENFASSUNG

Mit Hilfe der g.l.c., der u.v., i.r., n.m.r., und Massenspektrometrie wird die Struktur der durch Oxydation der L-Ascorbinsäure in wässriger Lösung gebildeten Dehydroascorbinsäure bestimmt, die hauptsächlich in bicyclischer und hydratisierter Form vorliegt, *i.e.* 3,6-Anhydro-L-xylo-hexulono-1,4-lacton-hydrat.

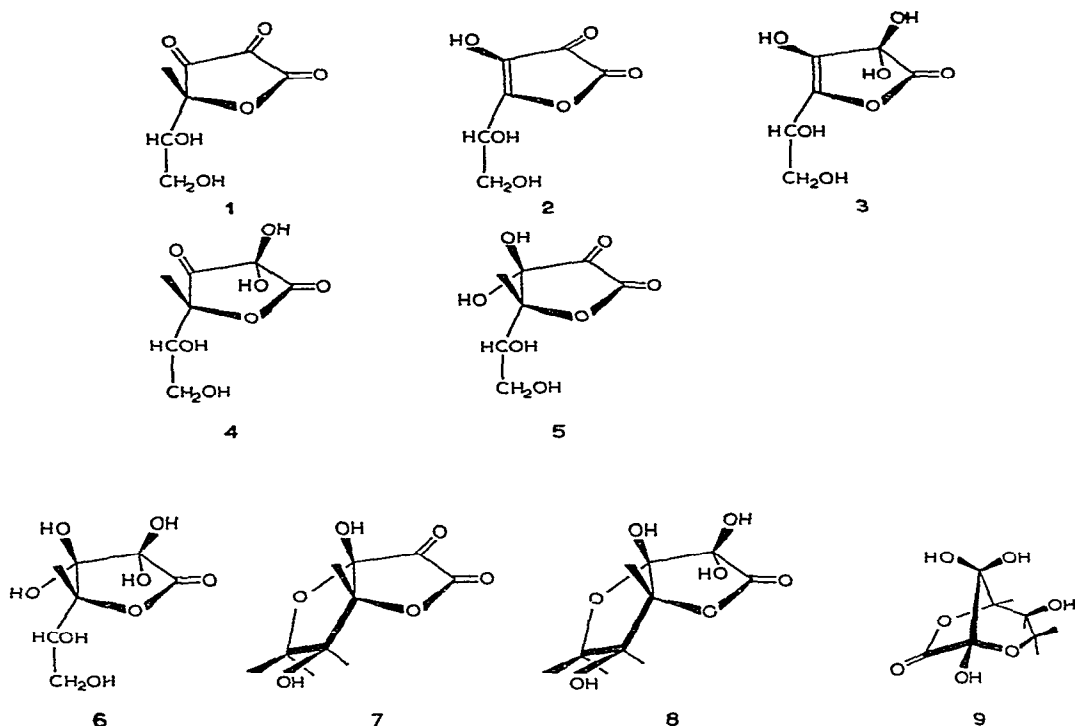
EINLEITUNG

Dehydroascorbinsäure als erstes Oxydationsprodukt von Vitamin C wird häufig als 2,3-Diketoverbindung (1) wiedergegeben^{1,2}. Ihre Farblosigkeit in wässriger Lösung widerspricht jedoch dieser Formulierung³. Insgesamt werden 9 Strukturen (1–9) als theoretisch möglich zur Diskussion gestellt^{4–8}. Während in wasserfreiem Medium für Methyläther- und Acetylderivate⁶ bzw. für die Hydrazone die bicyclische Struktur 8 durch n.m.r.-Messungen wahrscheinlich gemacht wurde, fehlen für die biologisch wichtige wässrige Lösung direkte experimentelle Befunde. Aufgrund von Strukturmodellbetrachtungen und Additionsreaktionen mit schwefliger Säure wird die Struktur 8 jedoch unter anderen auch für die wässrigen Systeme angenommen⁷. Eine Klärung dieser Frage ist vor allem aus ernährungsphysiologischen und lebensmitteltechnologischen Gründen von Bedeutung.

Die von uns entwickelte Methode³ zum gaschromatographischen Nachweis der Ascorbinsäure und ihrer Oxydationsprodukte, bei der wässrige Systeme durch einen Kälteschock fixiert, dann lyophilisiert und die Verbindungen im wasserfreien

*Dem Gedenken von Dr. Hewitt G. Fletcher, Jr. gewidmet.

†Zum Teil aus der Dissertation von F. Marx, Bonn 1975.



Medium pertrimethylsilyliert werden, bietet hier neue Möglichkeiten der Strukturauflösung. Ihre Kombination mit der Massen-, i.r.- und n.m.r.-Spektroskopie führt zu einem weitgehend gesicherten Strukturvorschlag.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Die nach Pecherer⁹ hergestellte „wasserfreie Dehydroascorbinsäure“ ist dimer¹⁰. Beim Auflösen in warmem Wasser zerfällt sie in ein monomeres Produkt, dessen Struktur nachfolgend aufgeklärt wird. Es ist gaschromatographisch, massen-, i.r.- und u.v.-spektrometrisch identisch mit Produkten, die man bei der Oxydation von Ascorbinsäure in wässriger Lösung (mit *p*-Benzochinon¹¹, bzw. mit molekularem Sauerstoff¹⁰) in wechselnden Ausbeuten erhält (vgl. Abb. 1).

Das i.r.-Spektrum der per-*O*-trimethylsilylierten Verbindung weist eine starke Bande bei 1805 cm⁻¹ auf, die der Carbonyl-Struktur eines gesättigten 5-Ringlaktons zugeordnet werden kann. Es fehlen die Keton-Carbonylbande im i.r.-Bereich bei 1660–1740 cm⁻¹ ebenso wie Absorptionen im u.v.-Bereich oberhalb 220 nm. Prinzipiell die gleichen Absorptionen findet man in den i.r.- bzw. u.v.-Spektren der nicht trimethylsilylierten Verbindung. Demzufolge können die Strukturen 1, 2, 4, 5 und 7 für das Per-*O*-trimethylsilyl-Derivat und die Dehydroascorbinsäure selbst auch in wässriger Lösung ausgeschlossen werden.

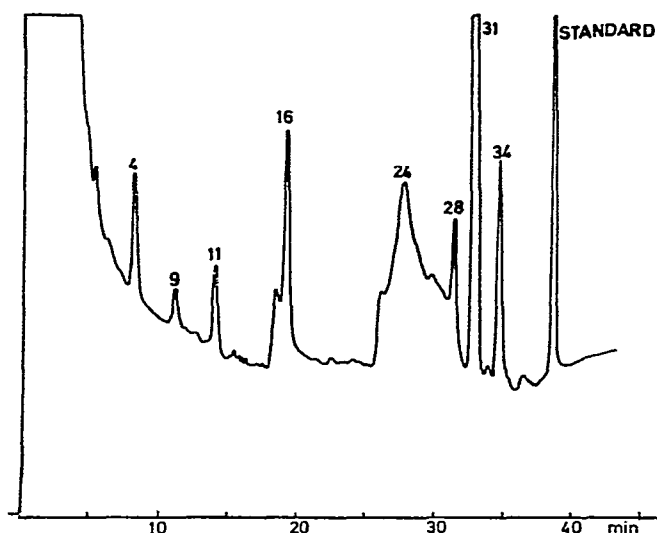


Abb. 1. Gaschromatogramm von Per-*O*-trimethylsilyldehydroascorbinsäure, dargestellt durch Oxydation von Ascorbinsäure mit *p*-Benzochinon in wässriger Lösung (Dehydroascorbinsäure, 31; Ascorbinsäure, 34).

Aus dem Massenspektrum (Abb. 2) ergibt sich das Molekulargewicht zu 480. Daraus folgt zwingend, daß die Verbindung vier silylierbare Hydroxyl-Gruppen enthält. Damit scheiden die Strukturen 3 und 6 aus, 8 und 9 sind mit dem Befund vereinbar. Bei der Fragmentierung hat das Ion m/e 245 für Struktur 8 die Bedeutung eines Schlüsselbruchstücks. Seine Bildung aus 9 würde die Spaltung von drei statt zwei C-C-Bindungen erfordern. Seine hohe Intensität (27%) macht die energetisch begünstigte Bildung aus 8 deutlich. Die Ringstruktur von m/e 245 weist außerdem darauf hin, daß der 3,6-Anhydroring der Dehydroascorbinsäure erhalten geblieben ist, eine Beobachtung, die Heyns und Scharmann¹² auch bei permethylierten 3,6-Anhydrohexofuranosiden gemacht haben. Die Bildung der etwa gleich intensiven Fragmente m/e 305 und m/e 307 macht zwei getrennte Abbauwege *b* und *c* wahrscheinlich. Im Fall *b* ist der Laktonring erhalten geblieben, aus dem dann m/e 307 gebildet wird. Die Struktur des Bruchstückes m/e 333 ist nicht festzulegen. Seine

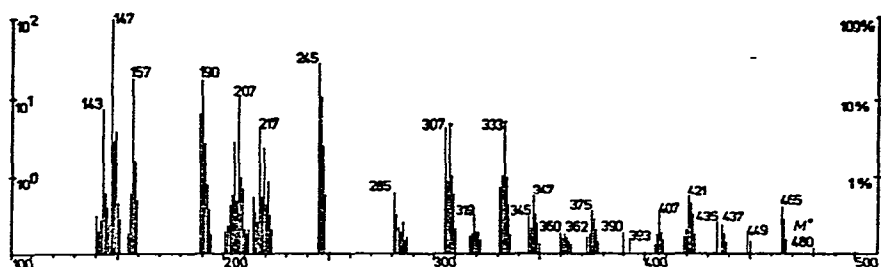
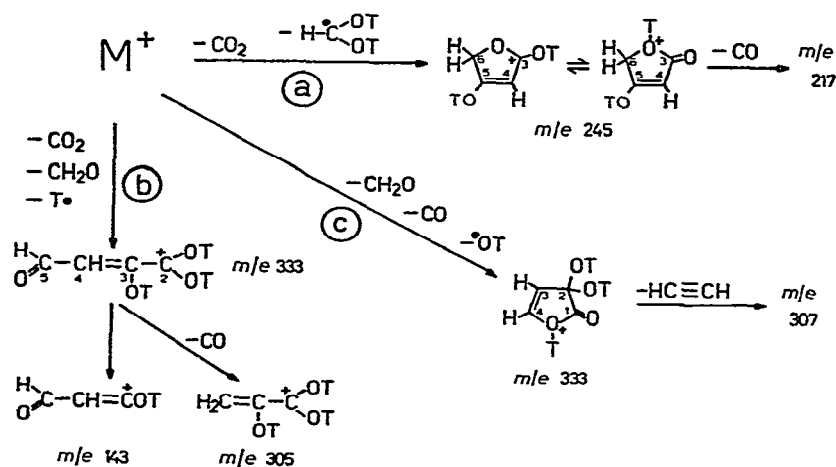


Abb. 2. Massenspektrum der Per-*O*-trimethylsilyldehydroascorbinsäure (MS 30, 20 eV, 200°).



Schema 1

Masse wurde durch Peakmatching zu 333,1307 gefunden, während sich die Masse zu m/e 333,1373 berechnet. Alle weiteren bezifferten Massenzahlen des Spektrums können zwanglos aus Struktur 8 abgeleitet werden. Damit nehmen wir die Struktur 8 als wahrscheinlich für die Dehydroascorbinsäure an.

Es war noch zu prüfen, ob auch in wässriger Lösung die Dehydroascorbinsäure tatsächlich in der Struktur 8 vorliegt, oder ob die Anhydridbildung möglicherweise bei der Probenaufbereitung, insbesondere während der Gefriertrocknung und Per-*O*-trimethylsilylierung abläuft. Eine Unterscheidung der monocyclischen, offenen Form 6 von der bicyclischen Form 8 in wässriger Lösung sollte durch ^1H -n.m.r.-Spektroskopie möglich sein. Die (präparativ nicht verfügbare) offene Form 6 der Dehydroascorbinsäure und die verfügbare L-Ascorbinsäure weisen dasselbe Strukturelement $\text{HOH}_2\text{C}-6-\text{C}-5-\text{HOH}-$ in ähnlicher nächster Umgebung auf und sollten daher entsprechende und vergleichbare Resonanzen im n.m.r.-Spektrum zeigen. Man findet bei der L-Ascorbinsäure (vgl. Abb. 3 links) im Bereich 3,75 p.p.m. eine Signalgruppe, die der Struktur $(\text{HO}-\text{C})-\text{CH}_2-\text{OH}$, bei 4,1 p.p.m. Resonanzlinien, die der Struktur $(\text{HO}-\text{C})-\text{CH}-\text{OH}$ zugeordnet werden. Ihr Intensitätsverhältnis beträgt 2:1. Die chemischen Verschiebungen der genannten Strukturelemente in der L-Ascorbinsäure stimmen mit denen vergleichbarer Substanzen innerhalb eines sehr engen Streubereichs überein. Im n.m.r.-Spektrum der Dehydroascorbinsäure (vgl. Abb. 3 Mitte) sind demgegenüber in diesen Bereichen keine Resonanzen zu beobachten. Daraus folgt, daß die offene Form 6 in wässriger Lösung nicht vorliegt.

Die Bildung der bicyclischen Struktur 8 läßt dagegen eine erhöhte Entschirmung und damit eine chemische Verschiebung der Signalgruppen nach tieferem Feld erwarten. Addiert man die Inkremente der Substituenten¹³ für den Strukturbereich $(\text{HOC}-3-\text{O})-\text{C}-6-\text{H}_2-\text{C}-5-\text{HOH}-\text{C}-4-\text{H}-(\text{O}-\text{C}=\text{OR})$ der bicyclischen Form 8,

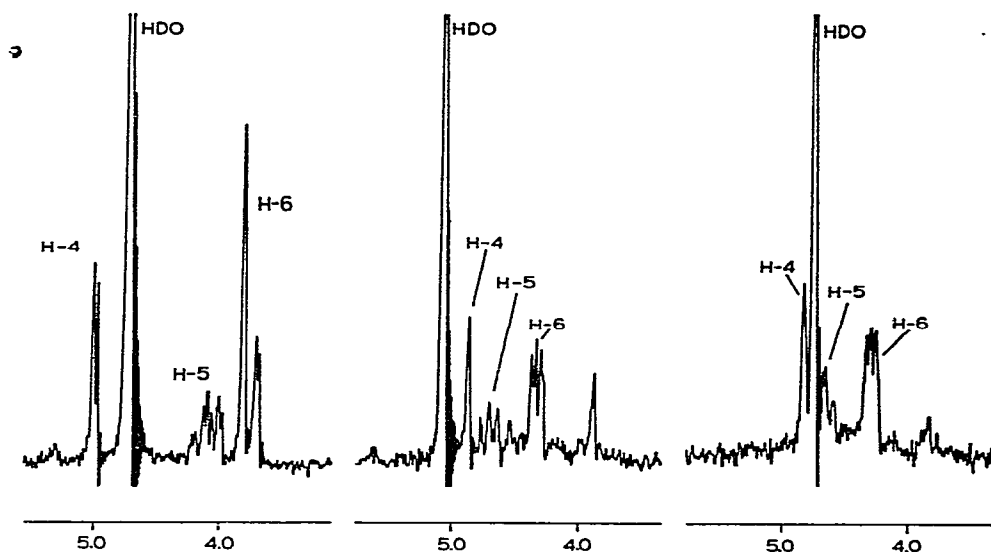


Abb. 3. ^1H -n.m.r.-Spektren von Ascorbinsäure (links), Dehydroascorbinsäure unter Zusatz von Deuteriumchlorid (Mitte), Dehydroascorbinsäure ohne Deuteriumchlorid (rechts), alle in Deuteriumoxyd.

dann findet man eine berechnete chemische Verschiebung von 4,30 p.p.m. für die C-6-Protonen, die mit dem gefundenen Wert von 4,30 p.p.m. gut übereinstimmt. Für die offene Form berechnet sich der Wert 3,61 p.p.m. Dieses Ergebnis bestätigt die Annahme einer bicyclischen Struktur 8.

Weitere Untersuchungen mit der n.m.r.-Spektroskopie und eine tiefergehende Analyse der n.m.r.-Spektren der Dehydroascorbinsäure in wässriger Lösung sind im Gange.

Faßt man die Ergebnisse der Massenspektrometrie und die der n.m.r.-Spektrometrie zusammen, dann ist die Annahme der Struktur 8 der Dehydroascorbinsäure in wässriger Lösung gerechtfertigt.

EXPERIMENTELLER TEIL

Man löste „wasserfreie Dehydroascorbinsäure“ nach Pecherer⁹ in warmem Wasser und prüfte die erhaltene monomere Dehydroascorbinsäure gaschromatographisch auf ihre Reinheit (~95%). Die Pertrimethylsilylierung und gaschromatographische Trennung erfolgte⁷ mit einem Gaschromatographen Typ 5750 der Fa. Hewlett-Packard. Man leitete das g.l.c.-Eluat über einen Allglasseparator der Fa. AEI in die Ionenquelle (20 eV, 200°) eines Massenspektrometers Typ MS 30 der Fa. AEI, registrierte den Totalionenstrom und vom g.l.c.-Peak P 31 das Massenspektrum. Zur Aufnahme des i.r.-Spektrums wurde das Eluat von Peak 31 in einer Mikroküvette gesammelt und das Spektrum mit einem Spektrometer Typ 257 der Fa. Perkin-Elmer registriert.

Durch kurzes Erwärmen „wasserfreier Dehydroascorbinsäure“ nach Pecherer⁹ in Deuteriumoxyd (99,9 %, Merck Nr. 3428, Merck A.G., Darmstadt, W. Deutschland) auf 55° wurde eine gesättigte Lösung der monomeren Dehydroascorbinsäure hergestellt und das ¹H-n.m.r.-Spektrum mit einem 60 MHz-n.m.r.-Gerät Typ R 24 der Fa. Perkin-Elmer aufgenommen. Um den linken Teil der Signalgruppe für H-5 sichtbar zu machen, der unter dem HDO-Signal liegt, wurde dieses durch Zugabe von etwas konz. Deuteriumchlorid um 0,3 p.p.m. nach tieferem Feld verschoben. Dies bedingt jedoch eine Zersetzung der Dehydroascorbinsäure, die auch bei sofortiger Messung merklich ist.

DANK

Wir danken der Arbeitsgemeinschaft Industrieller Forschungsvereinigungen e.V. und dem Forschungsbereich der Ernährungsindustrie e.V. für die großzügige finanzielle Unterstützung der Arbeit.

LITERATUR

- 1 M. FEDOROŇKO, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 29 (1974) 169.
- 2 W. H. SEBRELL UND R. S. HARRIS, *The Vitamins* Vol. 1, Academic Press, New York, 1969, S. 307.
- 3 K. PFEILSTICKER UND F. MARX, *Chromatographia*, 7 (1974) 366–368.
- 4 H. ALBERS, E. MÜLLER UND H. DIETZ, *Z. Physiol. Chem.*, 334 (1963) 243–258.
- 5 R. HÜTTENRAUCH, *Dtsch. Apoth. Ztg.*, 46 (1965) 1621–1624.
- 6 H. EGGE, *Tetrahedron Lett.*, 10 (1969) 801–803.
- 7 K. WISSER, J. VOLTER UND W. HEIMANN, *Nahrung*, 13 (1969) 599–606.
- 8 H. EL KHADAM, M. H. MESHREKI, S. H. EL ASHRY UND M. EL SEKEILI, *Carbohydr. Res.*, 21 (1972) 430–439.
- 9 B. PECHERER, *J. Am. Chem. Soc.*, 73 (1951) 3727–3830.
- 10 F. MARX, Dissertation Universität Bonn, 1975.
- 11 H. v. EULER UND H. B. EISTERT, *Chemie der Reduktone und Reduktonate*, Ferdinand Enke, Stuttgart, 1957, S. 224.
- 12 K. HEYNS UND H. SCHARMANN, *Carbohydr. Res.*, 1 (1966) 371–392.
- 13 H. STREHLÖW, *Magnetische Kernresonanz und chemische Struktur*, Steinkopff, Darmstadt, 1968, S. 31.