

Organische Katalysatoren. LXX¹⁾

Chelatkatalyse. XV

Wirkung von Kobalt-5-Sulfo-salicylaldehyd-äthylendiimin auf die Ascorbinsäureoxydation und die nichtenzymatische Hydroxylierung

Von RÜDIGER SELKE UND HANS-WALTER KRAUSE

Mit 4 Abbildungen

Inhaltsübersicht

Die katalytische Wirkung von Kobalt-5-Sulfo-salicylaldehyd-äthylendiimin auf die Ascorbinsäureoxydation wird untersucht und mit der Wirkung des Eisenchelates der Äthylendiamintetraessigsäure verglichen. Die beiden Chelate unterscheiden sich in der Fähigkeit, Aromaten in Gegenwart von Ascorbinsäure zu hydroxylieren und in der Größe der bei der Ascorbinsäureoxydation auftretenden CO₂-Entwicklung.

In dem von UDENFRIEND u. Mitarb.²⁾³⁾ beschriebenen gepufferten System: Ascorbinsäure, Eisen und Sauerstoff können Aromaten im pH-Bereich von etwa pH 3—7,5 besonders gut in Gegenwart von EDTA⁴⁾ hydroxyliert werden. Auffallend ist die Sonderstellung des Eisens. Nach den Angaben des Autors sinkt der Hydroxylierungsgrad durch Kupfer oder Kobalt auf 5 bis 10% des Eisenwertes. Es ergab sich nun die Frage, ob die Wirkung von EDTA auf einer Lösungsvermittlung beruht, oder ob hier Zusammenhänge

¹⁾ LXIX. Mitt.: H.-W. KRAUSE, J. prakt. Chem. [4] **22**, 241 (1963).

²⁾ S. UDENFRIEND, C. T. CLARK, J. AXELROD u. B. B. BRODIE, J. biol. Chemistry **208**, 731 (1954).

³⁾ B. B. BRODIE, J. AXELROD, P. A. SHORE u. S. UDENFRIEND, J. biol. Chemistry **208**, 741 (1954).

⁴⁾ Verwendete Abkürzungen:

EDTA = Äthylendiamintetraessigsäure

NTE = Nitrilotriessigsäure

SSAD = 5-Sulfo-salicylaldehyd-äthylendiimin

AH₂ = Ascorbinsäure

mit der in der Literatur⁵⁾ beschriebenen peroxydatorischen⁶⁾ Wirkung des Eisen-EDTA bestehen, wie sie auch durch die Arbeiten von BUHLER und MASON⁷⁾ nahegelegt werden, die über die hydroxylierende Wirkung der natürlichen Peroxydase in Gegenwart von Dihydroxyfumarsäure berichten. Im Falle eines Zusammenhanges zwischen der peroxydatorischen Wirkung des Eisen-EDTA und seiner Fähigkeit, in Gegenwart von Ascorbinsäure Aromaten zu hydroxylieren, konnte man annehmen, die hydroxylierende Wirkung des Kobalts mit Chelatbildnern zu steigern, die die peroxydatorische Wirksamkeit des Kobalts heraufsetzen. Wir verwendeten daher SSAD, da nach LANGENBECK und OEHLER⁸⁾ Kobalt-SSAD stark peroxydatorisch wirksam ist.

Die für Eisen-EDTA allgemein bekannte⁹⁻¹¹⁾ ascorbinsäureoxydatorische Wirkung⁶⁾ ließ sich auch für Kobalt-SSAD nachweisen¹²⁾¹³⁾ (s. Abb. 1). Eine Steigerung der hydroxylierenden Wirkung auf zugesetzte Salicylsäure war jedoch durch Kobalt-SSAD gegenüber der Blindprobe mit Kobalt nicht zu erreichen. Die Ergebnisse der Hydroxylierungsversuche nach 4- bzw. 48stündiger Reaktionsdauer in Phosphatpuffer pH 6,4 sind in Tab. 1 wiedergegeben, in der nur die gebildete Gentisinsäure aufgeführt ist. Gleichzeitig entsteht 2,3-Dihydroxybenzoesäure¹⁴⁾. Die erst nach längerer Reaktionszeit als Folge weiterer Oxydation der primären Hydroxylierungsprodukte auftretenden Verbindungen haben wir nicht näher untersucht. Auf dem Chromatogramm des Versuches in Gegenwart von Eisen-EDTA nach 48 Stunden erscheinen bis zu 5 Produkte, die im UV violett, gelbgrün und hellviolett fluoreszieren und bei den angewendeten Laufmitteln durchwegs niedrigere R_f -Werte als die Gentisinsäure bzw. 2,3-Dihydroxybenzoesäure zeigen. Ihr Erscheinen erklärt den bei Eisen-EDTA nach 48 Stunden erniedrigten Wert für Gentisinsäure.

Aus Tab. 1 ist außerdem ersichtlich, daß die Hydroxylierung in Gegenwart von Ascorbinsäure auch in den Blindsystemen: EDTA und Puffer bzw.

⁵⁾ P. MADER, J. Amer. chem. Soc. **82**, 2956 (1960).

⁶⁾ Zur Nomenklatur der organischen Katalysatoren, vgl. W. LANGENBECK, Mber. dtsh. Akad. Wiss. Berlin **5**, 32 (1963).

⁷⁾ D. R. BUHLER u. H. S. MASON, Arch. Biochem. Biophysics **92**, 424 (1961).

⁸⁾ W. LANGENBECK u. K. OEHLER, Chem. Ber. **89**, 2455 (1956).

⁹⁾ E. TANNER, W. SCHULER u. R. MEIER, Helv. chim. Acta **42**, II 445 (1959).

¹⁰⁾ C. FLESCHE, W. SCHULER u. R. MEIER, Helv. chim. Acta **42**, 2014 (1960).

¹¹⁾ L. CHAPON, Rev. Fermentations et Ind. Aliment **16**, 179 (1961).

¹²⁾ Neuere Arbeiten über die ascorbinsäureoxydatorische Wirkung von Kobaltchelaten siehe M. T. BECK u. S. GÖRÖG, Acta chim. Acad. Sci. hung. **29**, 401 (1961).

¹³⁾ A. C. KUDRJAVCEV, J. A. SAVIČ, N. KUNDO u. L. A. NIKOLAEV, Zurnal fizičeskoj Chimii **36**, 1382 (1962).

¹⁴⁾ R. R. GRINSTEAD, J. Amer. chem. Soc. **82**, 3472 (1960).

Tabelle 1

Hydroxylierung von Salicylsäure in Gegenwart von Ascorbinsäure und Metallchelaten. Die Konzentrationen sind die gleichen wie bei Abb. 1 angegeben. Konzentration an Salicylsäure = $1,67 \cdot 10^{-2}$ Mol/l.

	4 Stunden bei 37 °C geschüttelt		weitere 44 Stunden bei Zimmer- temperatur, ungeschüttelt	
	gebildete Genti- sinsäure in γ	% der eingesetz- ten Salicylsäure	gebildete Genti- sinsäure in γ	% der eingesetz- ten Salicylsäure
Fe-EDTA	16,2	31	12,8	25
Fe-NTE	12,3	24	14,9	29
EDTA	9,7	19	13,6	26
Cu-Dipyridyl	8,8	17	8,2	16
Cu	6,8	13	6,3	12
Fe	6,5	13	12,5	24
Fe-SSAD	6,3	12	7,5	15
Cu-EDTA	5,2	10	7,9	15
Cu-NTE	4,3	8	7,2	14
Cu-SSAD	4,2	8	5,1	10
Co-EDTA	3,7	7	7,5	15
Puffer pH 6,4	3,7	7	6,8	13
NTE	2,9	6	11,4	22
Co-NTE	2,6	5	9,1	18
Co	1,7	3	5,7	11
SSAD	1,4	3	0,8	2
Co-SSAD	1,0	2	0,0	0
nur ungepufferte AH ₂	0,6	1	1,7	3

nur mit Phosphatpuffer und in geringem Ausmaß bei längerer Reaktionszeit sogar ungepuffert stattfindet, was man evtl. auf vorhandene Metallspuren zurückführen kann.

Da die Hydroxylierung in jedem Fall, also auch in Gegenwart von Eisen, durch SSAD gehemmt wird, wurden die Hydroxylierungsversuche vorerst nicht fortgesetzt, sondern die ascorbinsäureoxydatorische Wirkung des Kobalt-SSAD näher betrachtet und auf Unterschiede zur Wirkung des Eisen-EDTA im gepufferten Ascorbinsäure-Luft-System hin untersucht.

Abb. 1 zeigt die Unterschiede in der Sauerstoffaufnahme für die einzelnen Systeme. Auffällig ist der relativ hohe Blindwert für Phosphatpuffer, der von FLESCH¹⁵⁾ auf Verunreinigung mit Metallkomplexen zurückgeführt wird. Wir konnten ihn durch Extraktion des Puffers mit Komplexbildnern nicht herabsetzen. Eine Behandlung mit Kationenaustauschern hatte ebenfalls nur geringen Einfluß. Mit Tris-Maleatpuffer pH 6,9 fanden wir einen nied-

¹⁵⁾ C. FLESCH, Int. Z. Vitaminforsch. **31**, 10 (1960).

rigeren Blindwert. Hohe Werte zeigten vor allem auch SSAD und etwas geringer EDTA ohne Metallzusatz. Auf ähnliche Befunde für andere Chelatbildner wird in der Literatur hingewiesen¹⁶⁾¹⁷⁾. Kobalt ohne Chelatbildner, welches bei den angewandten Konzentrationen nur teilweise in Lösung blieb,

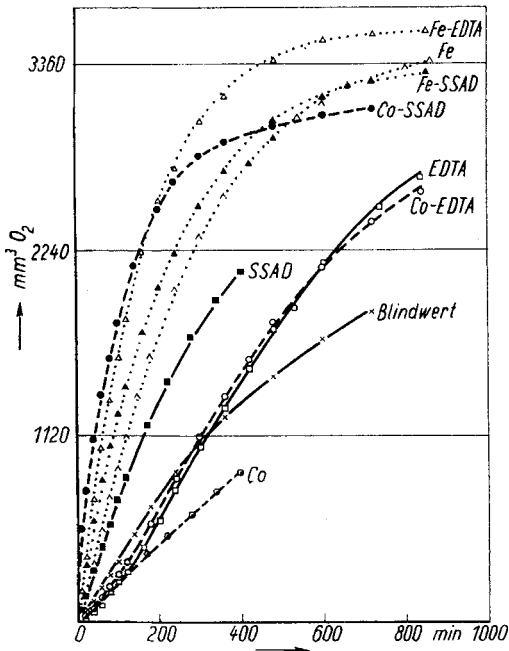
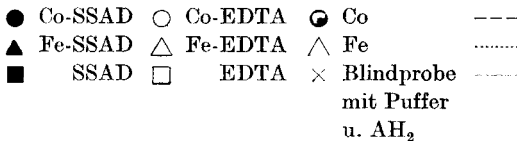


Abb. 1. Sauerstoffaufnahme von Ascorbinsäurelösungen bei pH 6,4 und 37 °C. Der Sauerstoffverbrauch für die Reaktion: $\text{AH}_2 + \frac{1}{2} \text{O}_2 \rightarrow \text{A} + \text{H}_2\text{O}$ liegt bei 1120 mm³. Ascorbinsäure $3,33 \cdot 10^{-2}$ Mol/l; Chelatbildner $6,67 \cdot 10^{-3}$ Mol/l; Metallchlorid $3,33 \cdot 10^{-3}$ Mol/l; Phosphatpuffer 0,167 Mol/l.



Die Konzentrationen und Zeichen gelten auch für Abb. 2—4

erniedrigte den Phosphatpuffer-Blindwert etwas. Die Blindwirkung des Eisens ist dagegen sehr groß und wird durch Komplexbildung mit SSAD oder EDTA noch erhöht. Das Kobalt-SSAD zeigte die größte Anfangsgeschwindigkeit, die allerdings ungewöhnlich schnell abnahm, was aus Abb. 2, in der die Reaktionsgeschwindigkeit logarithmisch gegen die Zeit aufgetragen wurde, besonders gut ersichtlich ist und worauf wir an anderer Stelle eingehen werden. Auf Abb. 2 wird auch für EDTA und das sich völlig gleichartig verhaltende Kobalt-EDTA eine Induktionsperiode deutlich sichtbar.

Alle Systeme entwickelten beträchtliche Mengen an CO_2 (Abb. 3). Aus vielen Arbeiten auch jüngeren Datums, in denen der Sauerstoffverbrauch manometrisch gemessen wurde, geht nicht hervor, ob dieser Tatsache Rechnung getragen wurde, obwohl die CO_2 -Entwicklung bei der Ascorbinsäureoxydation schon längere Zeit bekannt ist¹⁸⁾. Besonders

¹⁶⁾ E. S. YOUNATHAN u. E. FRIEDEN, *Biochim. biophysica Acta* (Amsterdam) **46**, 51 (1961).

¹⁷⁾ O. PIHAR, *Biochim. biophysica Acta* (Amsterdam) **56**, 159 (1962).

¹⁸⁾ C. NOFRE, A. CIER u. B. DREVON, *Bull. Soc. chim. France* **1960**, 245. Dort weitere Literatur.

auffallend ist die CO_2 -Entwicklung in Gegenwart von Eisen-EDTA, welches bei fast gleicher Sauerstoffaufnahme über 50% mehr CO_2 freisetzt als Kobalt-SSAD.

In Abb. 4 sind die respiratorischen Quotienten (R_Q) gegen die Zeit aufgetragen. Vergleicht man (Tab. 2) die Werte gegen Ende der Reaktion ($R_{Q(E)}$), die mit größerer Genauigkeit bestimmbar sind als die R_Q -Werte der Anfangsperiode und sich auch bei der Fortsetzung der Messungen nicht mehr wesentlich ändern, so sieht man, daß der $R_{Q(E)}$ -Wert der Blindprobe durch Eisen erhöht und durch Kobalt kaum geändert wird. Alle drei Systeme zeigen nach EDTA-Zusatz eine beträchtliche Vergrößerung der CO_2 -Entwicklung, wohingegen durch SSAD die $R_{Q(E)}$ -Werte sinken, was den bei der Hydroxylierung gefundenen Verhältnissen in auffälliger Weise entspricht (s. Tab. 1).

Diskussion der Ergebnisse

Bei den angewandten Konzentrationen steht im gepufferten Ascorbinsäuresystem der hinsichtlich der Sauerstoffaufnahme ähnlichen Wirkung von Eisen-EDTA und Kobalt-SSAD das unterschiedliche Verhalten in bezug auf die CO_2 -Entwicklung und vor allem die Aromatenhydroxylierung ge-

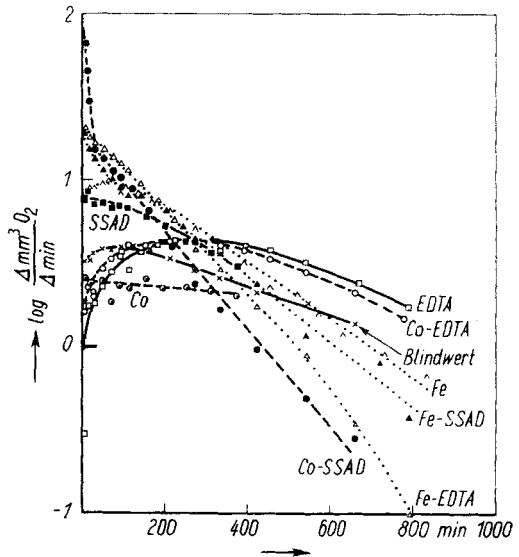


Abb. 2. Logarithmus der Geschwindigkeit der Sauerstoffaufnahme in Abhängigkeit von der Zeit (Konzentrationen und Zeichen s. Abb. 1)

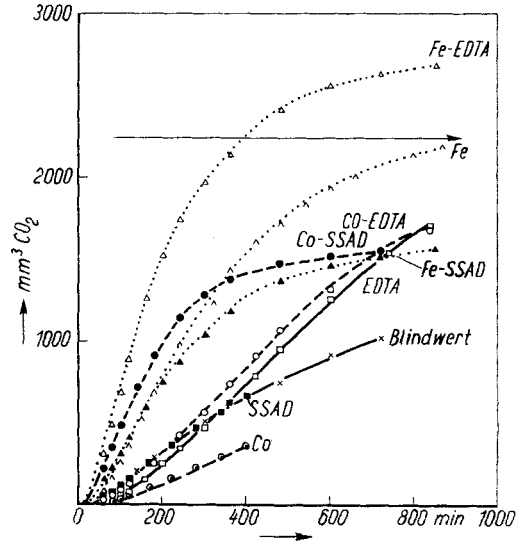


Abb. 3. CO_2 -Entwicklung im Verlauf der katalysierten Ascorbinsäureoxydation. Der Pfeil kennzeichnet den Wert 1 Mol CO_2 pro Mol Ascorbinsäure (Konzentrationen und Zeichen s. Abb. 1)

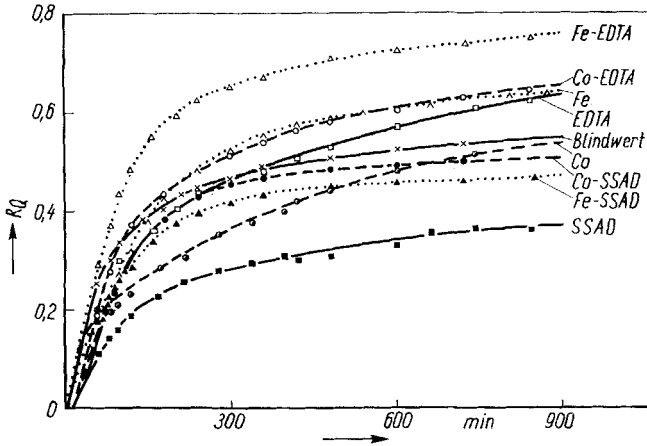


Abb. 4. R_Q -Werte (Konzentrationen und Zeichen s. Abb. 1)

genüber. Um diesen Unterschied erklären zu können, seien hier kurz die Vorstellungen gebracht, die man heute vom Mechanismus der Bildung der hydroxylierenden Agenzien in Gegenwart von Ascorbinsäure hat¹⁴⁾¹⁹⁾²⁰⁾:

1. Metallion niederer Wertigkeit und Wasserstoffperoxid bilden Hydroxylradikal, Hydroxylion und Metallion in der höheren Wertigkeitsstufe.
2. Das Hydroxylradikal greift den Aromaten unter Hydroxylierung an.
3. Das höherwertige Metallion wird durch die Ascorbinsäure wieder reduziert (zwei Einelektronenschritte in bezug auf die Ascorbinsäure).

Tabelle 2
Respiratorische Quotienten gegen Ende der Reaktion ($R_{Q(E)}$ -Werte). (Reaktionsbedingungen s. Abb. 1)

	$R_{Q(E)}$	Änderung gegenüber der Blindprobe in %
Fe-EDTA	0,76	+ 38
Co-EDTA	0,66	+ 20
EDTA	0,64	+ 16
Fe	0,65	+ 18
Phosphatpuffer	0,55	0
Co	0,54	- 2
Co-SSAD	0,51	- 7
Fe-SSAD	0,47	- 15
SSAD	0,37	- 33

4. Das benötigte Wasserstoffperoxid entsteht durch die metallkatalysierte Autoxydation eines Teils der Ascorbinsäure.

Die Wasserstoffperoxidbildung im Verlauf der Ascorbinsäureoxydation ist schon mehrfach postuliert und bestätigt worden²¹⁻²³⁾, kürzlich durch ZITO und KERTESZ²⁹⁾, die durch Zusatz von Katalase zum UDENFRIENDSchen System die Bildung des Katalase- H_2O_2 -Komplexes

¹⁹⁾ R. R. GRINSTEAD, J. Amer. chem. Soc. **82**, 3464 (1960).

²⁰⁾ R. BRESLOW u. L. N. LUKENS, J. biol. Chemistry **235**, 292 (1960).

²¹⁻²³⁾ s. S. 325.

spektrophotometrisch nachweisen konnten. Auch bei der durch Kobalt-SSAD katalysierten Ascorbinsäure-Oxydation entsteht Wasserstoffperoxid, worauf wir in Kürze näher eingehen werden.

Entscheidend für die schwach hydroxylierende Wirkung des Kobalts ist vielleicht die geringe Fähigkeit, die unter Punkt 1 angeführte Reaktion durchzuführen. Eine Näherungsrechnung nach den Daten von URI³⁰⁾ in der von SEMJONOW³¹⁾ angegebenen Weise ergibt die Gleichgewichtskonzentration an Hydroxylradikalen im neutralen Medium für die Reaktion: $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \cdot\text{OH}$.

Setzt man die Radikalkonzentration zu dem analog für Kobalt gewinnbaren Wert ins Verhältnis, so erhält man das Ergebnis:

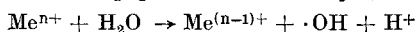
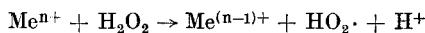
$$\frac{[\cdot\text{OH}]_{\text{Co}^{2+}}}{[\cdot\text{OH}]_{\text{Fe}^{2+}}} = 3,7 \cdot 10^{-9}.$$

Danach scheint eine Hydroxylierung durch Vermittlung des Kobalts zumindest unwahrscheinlich zu sein, auch wenn sich die Lage in Gegenwart von Ascorbinsäure und Chelatbildnern sehr ändern wird. Andererseits kann nicht übersehen werden, daß das Verhältnis für Kupfer günstig liegt:

$$\frac{[\cdot\text{OH}]_{\text{Cu}^+}}{[\cdot\text{OH}]_{\text{Fe}^{2+}}} = 1,4 \cdot 10^5,$$

d. h., daß mit Kupfer die Hydroxylierung eigentlich noch besser ablaufen sollte als mit Eisen, falls sich das Gleichgewicht in der Praxis auch schnell genug einstellt. Tatsächlich hydroxyliert jedoch Eisen besser als Kupfer, wengleich unsere Versuche nicht so ungünstige Werte ergaben (s. Tab. 1), wie sie UDENFRIEND fand.

Die Reaktionen:



²¹⁾ E. S. G. BARRON, R. H. DE MEIO u. F. J. KLEMPERER, J. biol. Chemistry **112**, 625 (1936).

²²⁾ P. HOLTZ u. G. TRIEM; Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **248**, 1 (1937).

²³⁾ C. M. LYMAN, M. O. SCHULTZE u. C. G. KING, J. biol. Chemistry **118**, 757 (1937).

²⁴⁾ A. O. DEKKER u. R. G. DICKINSON, J. Amer. chem. Soc. **62**, 2165 (1940).

²⁵⁾ D. B. HAND u. E. C. GREISEN, J. Amer. chem. Soc. **64**, 358 (1942).

²⁶⁾ E. SILVERBLATT, A. L. ROBINSON u. C. G. KING, J. Amer. chem. Soc. **65**, 137 (1943).

²⁷⁾ H. J. KAUFFMANN, J. Amer. chem. Soc. **73**, 4311 (1951).

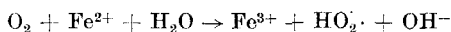
²⁸⁾ K. TOKUYAMA u. CH. R. DAWSON, Biochim. biophysica Acta (Amsterdam) **56**, 427 (1962).

²⁹⁾ R. ZITO u. D. KERTESZ, Biochim. biophysica Acta (Amsterdam) **54**, 197 (1961).

³⁰⁾ N. URI, Chem. Reviews **50**, 375, 391 (1952).

³¹⁾ N. N. SEMJONOW, Einige Probleme der chemischen Kinetik und Reaktionsfähigkeit. Deutsche Übersetzung G. WAGNER, Akademie-Verlag, Berlin 1961, S. 194.

werden eine geringe Rolle bei der Hydroxylierung spielen, da URI in der Reihe der Metalle Kobalt—Eisen—Kupfer steigende freie Reaktionsenthalpien angibt. GRINSTEAD führt die auch in Gegenwart von Katalase stattfindende Hydroxylierung auf $\text{HO}_2\cdot$ -Radikale zurück, die sich nach



bilden.

Daß der EDTA bei der eisenkatalysierten Hydroxylierung tatsächlich ein spezifisch fördernder Einfluß zukommt, erkennt man aus dem Vergleich mit NTE, deren Wirkung auch in den anderen Chelaten durchwegs geringer bleibt. Das stimmt mit Ergebnissen von HANAKI und ISHIDATE³²⁾ überein, die die N-Demethylierung von 4-N-Dimethylaminoazobenzol im Ascorbinsäure-Sauerstoff-System in Gegenwart verschiedener Eisenchelate untersuchten und gleiche Verhältnisse fanden. Sie führten den fördernden Einfluß von EDTA auf die Eisen-Wirkung zumindest teilweise auf die starke Erniedrigung des Redoxpotentials des FERRI-FERRO-Systems zurück. PRINCE³³⁾ teilt mit, daß EDTA bei der Polymerisation von Styrol-Butadien-Gummi die freie Eisen(II)-Konzentration auf einem Wert hält, der für die Bildung der zur Polymerisation benötigten freien Radikale optimal ist.

Die Untersuchungen zeigen, daß SSAD als Chelatbildner zur Vermittlung der Hydroxylierung ungeeignet ist. Wir vermuten, daß die oxydierenden Radikale den Katalysator selbst verändern (s. auch Abb. 2, ungewöhnlich starke Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit bei der Ascorbinsäureoxydation für Kobalt-SSAD und Eisen-SSAD in der Anfangsperiode). Die Frage soll mit Hilfe der Papierchromatographie beantwortet werden.

Die nähere Untersuchung der Folgeprodukte der Ascorbinsäureoxydation und der Ursachen der erhöhten CO_2 -Entwicklung der Reaktionen in Gegenwart von EDTA haben wir nicht durchgeführt, da sie über den Rahmen der vorliegenden Arbeit hinausgehen.

Beschreibung der Versuche

SSAD wurde nach LANGENBECK und OEHLER dargestellt⁸⁾.

Die Messungen von Sauerstoffverbrauch und CO_2 -Entwicklung wurden im Warburg-Apparat bei 37°C mit 3 ml Reaktionslösung vorgenommen. Zur CO_2 -Absorption bei den Messungen der Sauerstoffaufnahme wurde im Einsatz 0,1 ml 37proz. KOH benutzt. Die Komplexe wurden durch Zusammengeben von Chelatbildner-, Metallchlorid- und Pufferlösung etwa 1 Stunde vor Reaktionsbeginn an der Luft gebildet. Aus $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (p. a., Riedel-de Haen) und $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (p. a., Sojuzchimexport) hergestellte Metallsalzlösungen wurden komplexometrisch nach SCHWARZENBACH titriert. Die Ascorbinsäurelösungen wurden mit KOH auf $\text{pH} \approx 5,4$ gebracht und nach 10minütigem Eintemperieren zum Reak-

³²⁾ A. HANAKI u. M. ISHIDATE, *Biochim. biophysica Acta* (Amsterdam) **57**, 180 (1962).

³³⁾ A. K. PRINCE, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **88**, 512 (1960).

tionsgemisch gegeben. Alle Lösungen wurden mit bidestilliertem Wasser angesetzt (Quarkühler). Die pH-Werte wurden mit dem pH-Meßgerät MV 11 der Firma Clamann u. Grahner, Dresden, vor (durch Vermessung analoger Ansätze) und nach der Reaktion geprüft. Die Kontrolle der CO₂-Entwicklung durch Freisetzen des im Reaktionsgemisch noch gelösten CO₂ nach der Reaktion mittels 5n-Schwefelsäure ergab, daß bei pH 6,4 und der relativ hohen Ionenstärke $\mu = 0,37$ durchschnittlich höchstens 6% des entwickelten CO₂ durch die Reaktionslösung gebunden werden. Eine Berechnung der CO₂-Entwicklung nach der bei UMBREIT³⁴⁾ angegebenen Methode nach JOHNSON schied für unsere Messungen also aus. Wir verwendeten die einfachen Konstanten für die CO₂-Entwicklung, die sich mit Hilfe des BUNSENSCHEN Absorptionskoeffizienten für pH-Werte < pH 5 für 37°C: $\alpha_{\text{CO}_2} = 0,567$ ermitteln lassen.

Die so berechneten CO₂-Werte sind natürlich nicht sehr genau. Kontrollmessungen, bei denen die CO₂-Entwicklung gravimetrisch verfolgt wurde, lagen jedoch immer noch niedriger. Die Differenz ist erklärbar, wenn man bedenkt, daß im gravimetrischen Versuch durch die Reaktionslösungen (gleiche Konzentration, aber 10facher Ansatz) Luft perlt und das CO₂ eine gewisse Zeit benötigt, um am Absorptionsröhrchen anzulangen (maximal 30 Minuten).

Kohlenmonoxyd, welches NOFRE¹⁸⁾ bei der Ascorbinsäureoxydation durch Jod, allerdings nur in Abwesenheit von Phosphatpuffer, nachweisen konnte, wurde nicht gefunden (Erfassungsgrenze 10⁻⁴ Mol CO pro Mol oxydierte Ascorbinsäure).

Die Papierchromatographie wurde mit Papier WF 12 des VEB Niederschlag/Erzgebirge mit den von BUHLER und MASON⁷⁾ angegebenen Laufmitteln durchgeführt:

- A: Benzol : Propionsäure : Wasser = 2 : 2 : 1; obere Phase, absteigend
 B: n-Butanol : Eisessig : Wasser = 4 : 1 : 5; obere Phase, absteigend
 C: Isopropanol : Ammoniak₀ : Wasser = 8 : 1 : 1; aufsteigend.

Die erhaltenen R_F-Werte sind in Tab. 3 zu finden.

Tabelle 3

Substanz	Laufmittel	R _F -Werte		R _F -Werte nach BUHLER u. MASON ⁷⁾
		Vorderfront	hintere Front	
Salicylsäure	A	0,83 — 0,80		0,78
	B	0,94 — 0,91		0,91
	C	0,70 — 0,65		—
Gentisinsäure	A	0,39 — 0,37		0,38
	B	0,90 — 0,86		0,85
	C	0,58 — 0,53		0,50
2,3-Dihydroxybenzoesäure	A	0,49 — 0,46		0,49
	B	0,84 — 0,81		0,82
	C	0,47 — 0,40		0,36

³⁴⁾ W. M. UMBREIT, R. H. BURRIS u. J. F. STAUFFER, Manometric Techniques, Burgess Publ. Co., Minneapolis 1957, S. 32.

Außerdem wurden die Substanzen durch ihre unterschiedliche Fluoreszenz identifiziert. Die schlechten Werte für das Lösungsmittel C liegen sicher an abweichender Ammoniakkonzentration bei unseren Versuchen.

Die Versuche zur quantitativen Bestimmung der Hydroxylierung wurden bis auf die zusätzliche Anwesenheit von 50μ Mol Salicylsäure den Messungen der Sauerstoffaufnahme bzw. der CO_2 -Entwicklung entsprechend angesetzt. Die Hydroxylierung wurde nach 4stündiger Reaktion im Warburg-Apparat bei 37°C in Gegenwart von Luft bzw. nach weiteren 44 Stunden bei Zimmertemperatur durch Zugabe von 1 ml Reaktionslösung zu 0,5 ml Eisessig abgestoppt. Von diesen Lösungen wurden dann 30—90 μ l auf die Chromatogramme aufgetragen und mit Laufmittel A absteigend chromatographiert. Die nach ihrer Fluoreszenz markierten Gentisinsäureflecken wurden 3 Stunden mit 10 ml Äthanol eluiert und im Zeiss-Spektrophotometer VSU I bei 325 nm gegen einen in gleicher Weise erhaltenen Blindwert vermessen. Die Eichkurve wurde mit nach BRUNNER³⁵⁾ hergestellter Gentisinsäure im Bereich 0—25 γ durch je 6 Einzelwerte mit einem mittleren Fehler des Mittelwertes von $\pm 0,8 \gamma$ bestimmt. Nach oben ist die Methode durch die abnehmende Trennfähigkeit der Papierchromatogramme begrenzt. Die in analoger Weise vorgenommene Bestimmung der 2,3-Dihydroxybenzoesäure lieferte sehr stark streuende Einzelwerte, so daß auch die Mittelwerte, die in etwa der gleichen Größenordnung und Reihenfolge wie bei der Gentisinsäure liegen, mit einem großen Fehler behaftet sind und deshalb hier nicht wiedergegeben wurden.

Der Versuch, als Substrat Terephthalsäure zu verwenden, welches nur ein primäres Hydroxylierprodukt bilden kann, ergab keine besseren Werte. Auch hier wurden bei den Reaktionen mit Eisen-EDTA und Kupfer-EDTA nach 4 Stunden schon 2 Nebenprodukte in erheblichen Mengen gebildet. Kobalt-SSAD war hier ebenfalls völlig ohne hydroxylierende Wirkung.

Herrn Professor Dr. W. LANGENBECK danken wir für die Förderung der Arbeit. Für die geschickte Mithilfe bei der Ausführung der experimentellen Arbeiten sei Fräulein STAVE gedankt.

³⁵⁾ K. BRUNNER, Liebigs Ann. Chem. **351**, 321 (1907).

Rostock, Institut für organische Katalyseforschung der Deutschen Akademie der Wissenschaften zu Berlin.

Bei der Redaktion eingegangen am 15. Mai 1963.