

# Absorptionsspektrographische Studien an l-Ascorbinsäure II.<sup>1</sup>

Von

**E. Schauenstein.**

(Unter experimenteller Mitarbeit von **Johanna Pauritsch-Piller**  
und **Gertrud Uhlen.**)

Aus dem Institut für theoretische und physikalische Chemie  
der Universität Graz.

Mit 8 Abbildungen.

(Eingelangt am 10. Mai 1948. Vorgelegt in der Sitzung am 13. Mai 1948.)

Im folgenden soll die Autoxydation der Ascorbinsäure, die durch Zusatz bestimmter Stoffe beschleunigt oder verzögert werden kann, spektrographisch näher untersucht werden. Gleichzeitig soll die Leistungsfähigkeit der optischen Methode im Hinblick auf quantitative Ascorbinsäurebestimmungen kritisch überprüft und zu der bisher gebräuchlichsten chemischen Bestimmungsmethode mit *Tillmans-Reagens*<sup>2, 3, 4</sup> in Vergleich gesetzt werden.

## 1. Beschleunigte Oxydation.

Die Autoxydation von l-Ascorbinsäure wurde bereits in umfangreichen Arbeiten untersucht.<sup>5</sup> Nach *Ghosh* und *Rhakshit*<sup>6</sup> ist sie eindeutig als spezifische Eigenschaft von l-Ascorbinsäure anzusehen, die durch das Zusammentreffen von Ascorbinsäuremolekülen mit aktivierten gelösten Sauerstoffmolekülen erklärt wird. Die Geschwindigkeit der

<sup>1</sup> Vgl. *E. Schauenstein*, Absorptionsspektrographische Studien an l-Ascorbinsäure I. Mh. Chem. **79**, 487 (1948).

<sup>2</sup> *J. Tillmans*, Z. Unters. Lebensmittel **54**, 33 (1927).

<sup>3</sup> *W. Reissner*, Dissertation München, 1940.

<sup>4</sup> *R. Strohecker* und *R. Vaubel*, Angew. Chem. **49**, 666 (1936).

<sup>5</sup> *H. Schümmer*, Biochem. Z. **304**, 1 (1940).

<sup>6</sup> *J. C. Ghosh* und *P. C. Rhakshit*, Biochem. Z. **289**, 15 (1937).

Reaktion hängt vom  $p_{\text{H}}$ -Wert entscheidend ab und kann durch Metallionen (Kupfer, Eisen) bedeutend erhöht, durch die Anwesenheit von Schwefelverbindungen, aber auch von Metaphosphorsäure<sup>7</sup> erheblich herabgesetzt werden.

Im besonderen wurden folgende Oxydationsprozesse studiert:

a) Eine an Ascorbinsäure 0,001 m Lösung in reinstem, luftfrei gemachtem Wasser wurde im offenen Kolben der Einwirkung von Luft-sauerstoff ausgesetzt.

b) Eine 0,001 m Ascorbinsäurelösung in reinstem Wasser mit  $4 \cdot 10^{-4}$  Molen  $\text{Cu}^{++}$  ( $\text{CuSO}_4$ , Merck, puriss.) versetzt.

c) Eine 0,001 m Ascorbinsäurelösung in reinstem Wasser mit  $4 \cdot 10^{-4}$  Molen  $\text{Fe}^{++}$  ( $\text{FeSO}_4$ , Merck, puriss.) versetzt.

d) Bestrahlung einer 0,001 m Ascorbinsäurelösung in reinstem Wasser mit ultraviolettem Licht.

Alle Lösungen, auch die der Stabilisierungsversuche, befanden sich in mit Schliffstopfen verschlossenen Meßkolben aus Jenaer Geräteglas und wurden im Thermostaten bei  $20,0^\circ\text{C}$  im Dunkeln aufbewahrt. Nach bestimmten Zeiten wurde eine Probe entnommen und daran mit der im I. Teil näher beschriebenen Methodik das ultraviolette Absorptionsspektrum gemessen. Zur Kompensation der Eigenabsorption der Lösungen wurde dabei stets die entsprechende ascorbinsäurefreie Lösung in die Vergleichsküvette gefüllt. Wie die Abb. 1 bis 8 zeigen, war es bei allen untersuchten Oxydationsreaktionen notwendig, einen Bereich von mindestens zwei Zehnerpotenzen (100 bis 10000) des molaren dekadischen Extinktionskoeffizienten  $\epsilon$  zu erfassen. Infolge der zur Verfügung stehenden größten Schichtdicke von 10 cm mußte stets mit Konzentrationen der Größenordnung  $10^{-3}$  m/l ( $c$  betrug für alle Versuche  $1,000 \cdot 10^{-3}$  m/l) gearbeitet werden. Mit Rücksicht auf die Angaben von *Herbert* und *Hirst*,<sup>8</sup> die ab 50 mg/100 ccm beträchtliche Abweichungen vom *Lambert-Beerschen* Gesetz feststellten, mußte für die obige Konzentration erst die Gültigkeit des Gesetzes überprüft werden. Dabei ergab sich, daß  $10^{-3}$  molare wäßrige Lösungen noch sicher im Gültigkeitsbereich liegen (die Testlösungen müssen gegen den Einfluß der Luftoxydation durch Zusatz von z. B. Metaphosphorsäure geschützt werden). Die in den verschiedenen Oxydationsstadien vorhandenen Ascorbinsäuremengen in Prozenten der Ausgangsmenge wurden dann jeweils aus der Proportion  $\epsilon_x : \epsilon = x : 100$  berechnet, worin  $\epsilon_x$  den aus den einzelnen Kurven im Maximum interpolierten molaren dekadischen Extinktionskoeffizienten bedeutet und  $\epsilon$  den unmittelbar nach dem Ansetzen der Lösungen gemessenen Extinktionskoeffizienten der reinen Ascorbinsäure. Außerdem wurde der Prozentgehalt der Lösungen laufend durch Titrationsen mit dem *Tillmanschen* Reagens ermittelt.

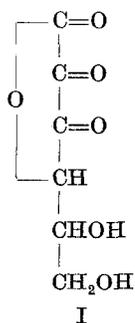
Die Abb. 1 bis 4 geben die spektrographischen Resultate wieder. Ganz allgemein geht zunächst daraus hervor, daß die Höhe des Maximums bei  $4100 \text{ mm}^{-1}$  mit fortschreitender Oxydation absinkt, woraus sich ergibt, daß im Laufe der Oxydation die Zahl der am Absorptionsakt

<sup>7</sup> *A. Sosa*, C. R. Acad. Sci., Paris **216**, 545 (1943).

<sup>8</sup> *R. W. Herbert* und *E. L. Hirst*, J. chem. Soc. London **1933**, 1280.

bei  $4100 \text{ mm}^{-1}$  beteiligten Ascorbinsäuremoleküle mit der Gruppierung  $\begin{array}{c} \diagup \\ \text{C}=\text{C}-\text{C}=\text{O} \\ \diagdown \end{array}$  ständig abnimmt. In den Endstadien wird hierbei ein Wert von  $\epsilon$  erreicht, der weniger als 5% der Gesamtabsorptionsstärke von Ascorbinsäure beträgt und somit unter der Fehlergrenze der von uns angewandten Meßmethode liegt. Daher wurde die Absorption der Endstoffe bei Berechnung der Prozente Ascorbinsäure in den einzelnen Stadien nicht berücksichtigt. Im Endzustand ist somit keine eindeutige Feststellung möglich, ob hier geringe Mengen von Ascorbinsäure oder die im Endstadium auftretenden Stoffe die Absorption hervorrufen.

Bei Betrachtung der Abb. 1 bis 4 erkennen wir ferner deutlich zwei Grenztypen: In einem Falle (Oxydation in Gegenwart von  $\text{Cu}^{++}$ , ferner durch den Sauerstoff der Luft) tritt bei der Oxydation über Zwischenstadien eine zweite niederfrequente Bande bei  $3250$  bzw.  $3370 \text{ mm}^{-1}$  auf, deren Höhe bis zur Erreichung des Endwertes von  $\log \epsilon = 2,40$  bzw.  $\log \epsilon = 2,59$  ständig zunimmt. In diesem Zusammenhang sind Messungen von *Mohler* und *Lohr*<sup>9</sup> zu erwähnen, die bei der Autoxydation von Ascorbinsäure in Gegenwart von Kupfer auf das Entstehen neuer Banden bei zirka  $3200$  bis  $3300 \text{ mm}^{-1}$  aufmerksam gemacht haben, die sie jedoch ohne weitere Diskussion lediglich als Zeichen einer „tiefgreifenden Veränderung der Ausgangssubstanz“ betrachteten. Sowohl die Frequenzlage als auch die Extinktionshöhe lassen beim Vergleich mit den Ergebnissen des I. Teiles erkennen, daß hier ein Stoff entsteht, dessen Konstitution durch ein System von drei miteinander konjugierten Carbonylchromophoren gekennzeichnet und der aller Wahrscheinlichkeit nach als reversibel oxydierte Form der Ascorbinsäure, als Dehydroascorbinsäure (I) anzusprechen sein dürfte.



Bei der Oxydation von Ascorbinsäure in Gegenwart von  $\text{Fe}^{++}$  und durch Bestrahlung mit ultraviolettem Licht (in Abb. 3 und 4 dargestellt) liegt nun der zweite Grenzfall vor: Auch hier nimmt die Absorption bei der Wellenzahl des Ascorbinsäuremaximums im Verlauf der Oxydation ab und zeigt so eine Abnahme des Ascorbinsäuregehaltes der Lösungen an. Hingegen fehlt jede Andeutung einer Vorbande. Es bestehen hier zwei Möglichkeiten: Entweder ist im Endzustand noch etwas Ascorbinsäure vorhanden und der bei der Oxydation entstandene Stoff ist in diesem Bereich durchlässig, oder es ist die Ascorbinsäure praktisch vollständig umgewandelt worden und der Endstoff zeigt im Ascorbinsäuregebiet eine im Verhältnis geringfügige Eigenabsorption. Jedenfalls geht aus den

<sup>9</sup> *H. Mohler* und *H. Lohr*, *Helv. chim. Acta* **21**, 485 (1938).

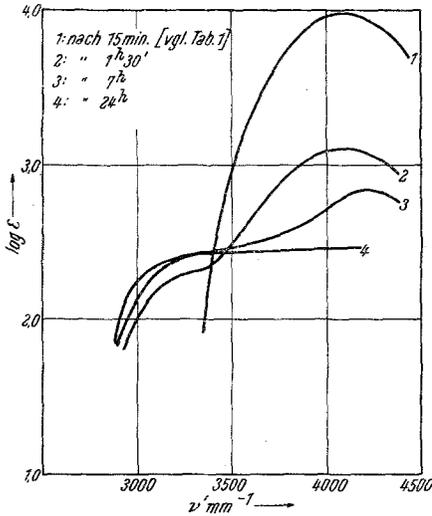


Abb. 1. Autoxydation bei Gegenwart von  $\text{Cu}^{++}$ .

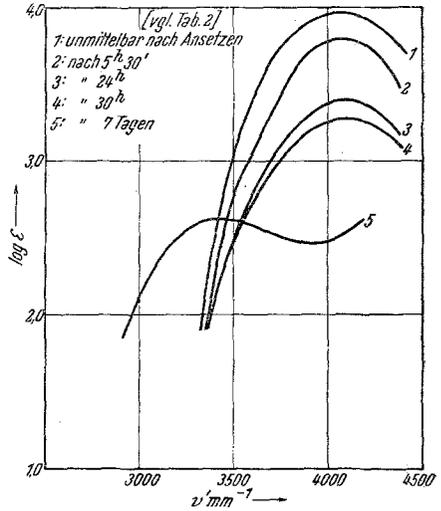


Abb. 2. Autoxydation durch Luftsauerstoff.

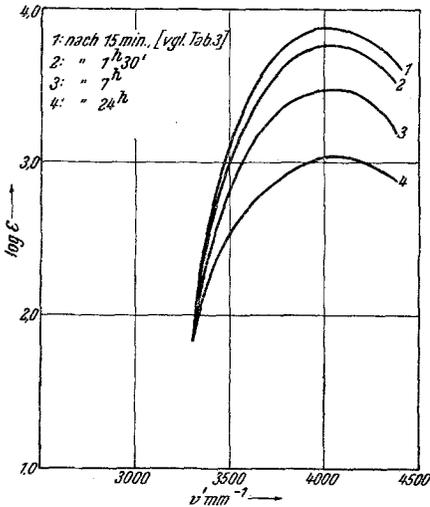


Abb. 3. Autoxydation bei Gegenwart von  $\text{Fe}^{++}$ .

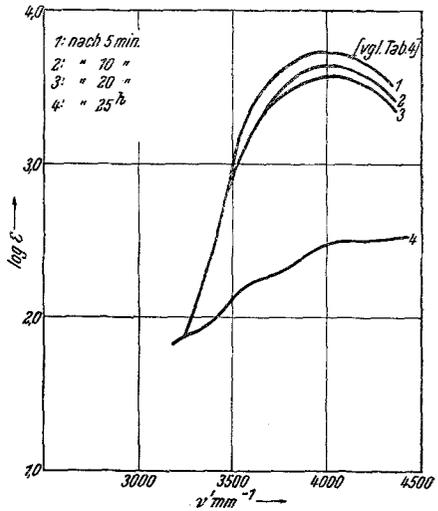


Abb. 4. Autoxydation bei UV-Bestrahlung.

Absorptionskurven eindeutig hervor, daß die Ascorbinsäureoxydation bei Anwesenheit von  $\text{Fe}^{++}$  zu einem ganz anderen Endkörper führt als die durch  $\text{Cu}^{++}$  katalysierte Umwandlung. Nach dem vorhin Gesagten folgt, daß bei der in Gegenwart von  $\text{Fe}^{++}$  durchgeführten Oxydation nicht die oben erwähnte Dehydroascorbinsäure entsteht,

sondern ein anderer Stoff, dessen antiskorbutische Eigenschaften jedoch noch nicht näher untersucht worden sind.

Wenn wir aus den Prozentgehalten der Lösungen an Ascorbinsäure, wie sie aus den Spektren erhalten wurden, die Oxydationsgeschwindigkeit in den einzelnen Versuchen entnehmen (Tabellen 1 bis 4), so sehen wir,

Tabelle 1.

Zeit	Maximum bei $4100 \text{ mm}^{-1}$			
	$\log \epsilon_{\text{max}}$	$\epsilon_{\text{max}}$	% Ascorbinsäure	% Ascorbinsäure titrimetrisch
15'	3,99	9795	100	100
1,30 <sup>h</sup>	3,16	1435	15	28
7,0 <sup>h</sup>	2,86	721	7	0
24,0 <sup>h</sup>	2,48	301	5	0

Tabelle 2.

Zeit	Maximum bei $4100 \text{ mm}^{-1}$			
	$\log \epsilon_{\text{max}}$	$\epsilon_{\text{max}}$	% Ascorbinsäure	% Ascorbinsäure titrimetrisch
0 <sup>h</sup>	3,97	9419	100	100
5,30 <sup>h</sup>	3,78	5984	64	38
24,0 <sup>h</sup>	3,40	2506	27	2
30,0 <sup>h</sup>	3,24	1746	19	0
7 Tage	2,64	436	5	0

Tabelle 3.

Zeit	Maximum bei $4100 \text{ mm}^{-1}$			
	$\log \epsilon_{\text{max}}$	$\epsilon_{\text{max}}$	% Ascorbinsäure	% Ascorbinsäure titrimetrisch
0'	3,99	9795	100	100
15'	3,88	7534	77	100
1,3 <sup>h</sup>	3,80	6295	64	71
7,0 <sup>h</sup>	3,48	3020	31	25
24,0 <sup>h</sup>	2,98	950	10	4

daß die besonders kräftige katalytische Wirkung des  $\text{Cu}^{++}$ -Ions die Gesamtmenge an Ascorbinsäure innerhalb etwa einer Stunde auf weniger als 20% der Anfangsmenge herunterdrückt.<sup>10</sup> Die Wirkung der Ultra-

<sup>10</sup> Die auffallende Sonderstellung des Kupfers bezüglich seines Einflusses auf die Geschwindigkeit der Autoxydation und die Natur des dabei

Tabelle 4.

Zeit	Maximum bei 4100 mm <sup>-1</sup>			
	log $\epsilon_{\max}$	$\epsilon_{\max}$	% Ascorbinsäure	% Ascorbinsäure titrimetrisch
5'	3,69	4898	50	72
10'	3,64	4335	44	33
20'	3,60	3954	40	19
25 <sup>h</sup>	2,48	301	5	0

violettbestrahlung läßt den Gehalt an Ascorbinsäure innerhalb einer halben Stunde auf etwa 40% sinken, läßt dann aber rasch nach. Noch schwächer ist die Wirkung des Fe<sup>++</sup>-Ions, dessen katalytische Wirkung schon nach etwa 15 Min. (noch etwa 70% Ascorbinsäure) erst langsam, dann rascher nachläßt.

Beim Vergleich der spektrographisch ermittelten Prozentwerte mit den durch Titration mit *Tillmans*-Reagens erhaltenen ergibt sich folgendes: Bei der Oxydation der Ascorbinsäure in Gegenwart von Cu<sup>++</sup>-Ion ist die Konzentration schon nach 7 Stunden auf 0% abgesunken, während das Spektrum den Endwert erst nach etwa 30 Stunden anzeigt. In den anderen Fällen ergeben beide Methoden fast konformen Oxydationsverlauf, jedoch ist zu bemerken, daß zumeist die nach der Titrationsmethode erhaltenen Prozentgehalte Ascorbinsäure ein früheres Ende des Vorganges anzeigen als die aus den Spektren erhaltenen Werte. Dies ist sicher darauf zurückzuführen, daß das *Tillmans*sche Reagens auf die in den vorgeschrittenen Stadien vorhandenen geringen Ascorbinsäuremengen nicht mehr anspricht, während das Absorptionsspektrum diese geringfügigen Anteile noch mit der dem Verfahren eigenen Fehlergrenze anzeigt. Jedenfalls stellt das Absorptionsspektrum die weitaus empfindlichere Bestimmungsmöglichkeit für Ascorbinsäure dar.

## 2. Verzögerte Autoxydation.

Nunmehr erschien es interessant, die durch bestimmte Stoffe verzögerte Autoxydation spektrographisch zu untersuchen, zumal solchen „Stabilisatoren“, die die Haltbarkeit des Vitamins erhöhen, nicht nur entstehenden Endproduktes ist sicherlich kein Zufall: Stellt doch z. B. die bei der biologischen Oxydation der Pflanzen entscheidend wichtige Ascorbinsäureoxydase (bzw. Brenzcatechinoxidase) ein Kupferprotein dar (vgl. hierzu z. B. *W. Bladergroen*, Physikalische Chemie in Medizin und Biologie, Basel: Wepf und Cie. 1945). Nach Untersuchungen von *W. Die-mair* und *K. Zerban*, *Biochem. Z.* **316**, 189 (1944), ist die oxydative Wirkung des Enzyms auf Ascorbinsäure nahezu proportional dem Gehalt an Kupfer, das in einer lockeren Komplexverbindung irreversibel an das Trägerprotein gebunden ist.

biologisch und ernährungstechnisch, sondern auch in der Praxis der quantitativen Bestimmungsmethoden hervorragende Bedeutung zukommt.

Nach den bisherigen Ergebnissen läßt das ultraviolette Absorptionsspektrum nicht nur eine exakte quantitative Messung der Oxydationsgeschwindigkeit, sondern im besonderen Aussagen darüber erwarten, über welche Zwischenstadien und zu welchen Endstoffen die Reaktion führt.

Es ist daher das Ziel der folgenden Untersuchungen, durch Zusatz von geeigneten Stoffen die Haltbarkeit von Ascorbinsäure zu erhöhen und diese „stabilisierende“ Wirkung bis zur vollständigen Umwandlung der Ascorbinsäure in ihre Oxydationsprodukte zu verfolgen.

Als Schutzstoffe wurden verwendet:

- |                        |                           |
|------------------------|---------------------------|
| a) Orthophosphorsäure, | c) wäßriger Haferextrakt, |
| b) Ammoniumrhodanid,   | d) Metaphosphorsäure.     |

Der Oxydationsverlauf wurde außer auf spektrographischem Wege durch laufende Titrations mit *Tillmans*-Reagens verfolgt. Zur Kontrolle der biologischen Wirksamkeit dienten Tierversuche an Meerschweinchen. Nachdem die Tiere auf Vitamin-C-freie Kost gesetzt wurden, zeigten sie bereits nach einer Woche deutliche Skorbuterscheinungen; in Niere und Leber der dann seziierten Tiere werden nur bestimmte geringe Mengen Ascorbinsäure gefunden. Wird den Tieren nunmehr täglich Vitamin C (auch als Dehydroascorbinsäure) zugeführt, so verschwinden die Skorbuterscheinungen, es tritt rasche Gewichtszunahme auf und in bestimmten Organen der dann seziierten Tiere zeigt ein entsprechend erhöhter Vitamin-C-Gehalt eine Speicherung von Ascorbinsäure an (Vgl. Anhang).

#### a) Stabilisierung mit Orthophosphorsäure.

Die Abb. 5 bis 8 geben die spektrographischen Ergebnisse der vier Stabilisierungsversuche wieder. Man ersieht daraus sofort, daß die Stabilisierung mit Orthophosphorsäure einen Sonderfall darstellt (Abb. 5). Während bei den übrigen Stabilisierungsreihen im Endstadium Stoffe mit dem in den vorangegangenen Untersuchungen eingehend studierten niederfrequenten Maximum bei  $3380\text{ mm}^{-1}$  auftreten, hat sich die Ascorbinsäure in Gegenwart von Orthophosphorsäure offenbar in einen oder mehrere Stoffe verwandelt, die zum Unterschied von den Endprodukten der anderen Stabilisierungsreihen im Gebiet von  $3000\text{ mm}^{-1}$  praktisch durchlässig sind und erst im Bereich ab etwa  $4500\text{ mm}^{-1}$  absorbieren. Bemerkenswert ist es jedoch, daß auch dieses Endstadium sich im Tierversuch als biologisch wirksam erwies. Tabelle 5 stellt die aus der Extinktion bei  $4100\text{ mm}^{-1}$  ermittelten Prozente Ascorbinsäure den durch Titration erhaltenen Prozenten gegenüber. Beide Bestimmungen ergaben ein ähnlich rasches Absinken des Ascorbinsäuregehaltes der Lösung; mit abnehmender Ascorbinsäurekonzentration unterschieden

sich jedoch die Werte immer mehr von den spektrographischen: Nach dem Titrationsergebnis waren nach 3 Tagen noch 45% Ascorbinsäure vorhanden, während das Spektrogramm nur mehr 6% erkennen ließ. Erst nach 5 Tagen wurde das *Tillmansche* Reagens nicht mehr reduziert.

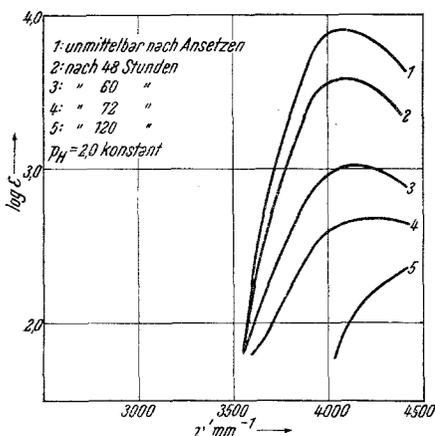
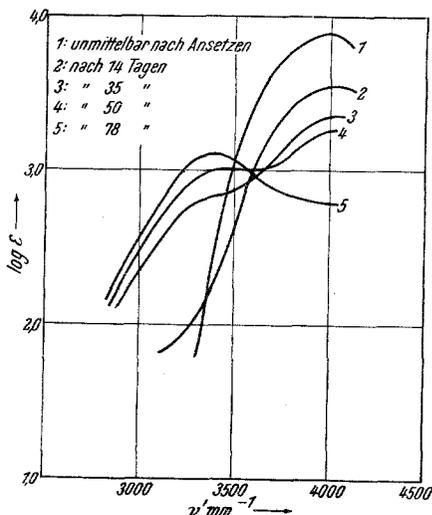

 Abb. 5. Stabilisierung mit  $H_3PO_4$ .

 Abb. 6. Stabilisierung mit  $CNS^-$ .

Tabelle 5.

Zeit	Hauptband bei $4100\text{ mm}^{-1}$			% Ascorbinsäure titrimetrisch
	$\log \epsilon_{\max}$	$\epsilon_{\max}$	% Ascorbinsäure	
0h	3,90	7943	100	100
24h	3,81	6457	81	
31h	3,74	5500	69	73
40h	3,67	4677	59	
48h	3,58	3802	48	64
60h	3,01	1023	13	
72h	2,67	468	6	45
120h	2,0	158	5	0

### b) Stabilisierung mit Rhodanion.

Die stabilisierende Wirkung des  $CNS^-$ -Ions hat schon *W. Halden*<sup>11</sup> untersucht. Infolge der Eigenabsorption des Rhodanions erwies es sich als notwendig, nur mit Lösungen zu arbeiten, deren Konzentration an  $NH_4CNS$  nicht größer als 0,1% war. Wie Tabelle 6 und Abb. 6 zeigen,

<sup>11</sup> *W. Halden, R. M. Czmiel und M. Weißenböck, Wiener Chem.-Ztg. 43, 58 (1942).*

Tabelle 6.

Zeit in Tagen	Niederfrequentes Band $\nu'_{\max} = 3350 \text{ mm}^{-1}$		Hauptband $\nu'_{\max} = 4120 \text{ mm}^{-1}$		% Ascorbinsäure	% Ascorbinsäure (titrimetrisch)
	$\log \epsilon_{\max}$	$\epsilon_{\max}$	$\log \epsilon_{\max}$	$\epsilon_{\max}$		
0	—	—	3,88	7500	100	100
3	—	—	3,88	7500	100	93
8	—	—	3,78	6030	79	86
14	Erste Andeutung		3,56	3631	44	83
21	2,58	380	3,44	2754	31	44
27	2,68	479	3,41	2541	28	18
35	2,78	603	3,37	2320	25	0
41	2,83	676	3,30	1995	20	0
49	3,00	1000	3,25	1778	17	0
63	3,08	1202	3,08	1202	9	0
71	3,09	1230	3,00	1000	6	0
78	3,09	1230	2,78	603	0	0

liegt das Maximum des entstehenden niederfrequenten Bandes bei  $3380 \text{ mm}^{-1}$  wesentlich höher, als beispielsweise die Maxima der Endstadien von Ascorbinsäureoxydationen in Gegenwart von Kupfer oder durch den Luftsauerstoff. Daraus ist zu erkennen, daß sich hier die Ascorbinsäure nicht in einen einzigen anderen Stoff umgewandelt hat; es müssen mehrere Stoffe entstanden sein, deren Absorptionsmaximum etwa bei  $3380 \text{ mm}^{-1}$  liegt, die aber im Gebiet des Ascorbinsäuremaximums ebenfalls noch beträchtlich absorbieren. Dafür spricht auch die Tatsache, daß die Kurven der einzelnen Zwischenstadien keinen gemeinsamen Schnittpunkt besitzen, worauf später noch zurückzukommen sein wird.

Bei der Berechnung der Prozente Ascorbinsäure muß nunmehr die Eigenabsorption der Begleitstoffe berücksichtigt werden. Setzen wir die Absorption der Endstoffe rein rechnerisch summarisch gleich  $\epsilon_2$  und bezeichnen wir mit  $\epsilon_1$  den molaren dekadischen Extinktionskoeffizienten der reinen Ascorbinsäure, so setzt sich nach dem Absorptionsgesetz die Extinktion der Schichtdickeneinheit  $m$  jeweils additiv aus den Moduln  $m_1$  und  $m_2$  zusammen,

$$m = m_1 + m_2, \quad (1)$$

wobei jeweils gilt

$$m = \epsilon_1 c_1 + \epsilon_2 c_2. \quad (2)$$

Hier bedeutet  $c_1$  die Konzentration an Ascorbinsäure in Molen/l,  $c_2$  die Konzentration der Endstoffe in Molen/l. Ferner gilt

$$m = \epsilon \cdot c, \quad (3)$$

wenn  $\epsilon$  den aus den einzelnen Kurven erhaltenen jeweiligen gesamten molaren, dekadischen Extinktionskoeffizienten und  $c$  die Gesamt-

konzentration in Molen/l darstellt. Setzt man nun  $c = c_1 + c_2$ , so ergibt sich durch Einsetzen von  $c_2 = c - c_1$  in (2)

$$m = \varepsilon_1 c_1 + \varepsilon_2 c - \varepsilon_2 c_1. \quad (4)$$

Daraus berechnet sich  $c_1$  zu:

$$c_1 = c \frac{\varepsilon - \varepsilon_2}{\varepsilon_1 - \varepsilon_2}. \quad (5)$$

Aus dieser Beziehung geht hervor, daß eine Bestimmung von  $c_1$  nur möglich ist, wenn sich  $\varepsilon_1$  und  $\varepsilon_2$  wesentlich voneinander unterscheiden. In unserem Falle, in dem  $\varepsilon_2$  um eine Zehnerpotenz kleiner ist als  $\varepsilon_1$ , kann die Formel (5) ohne weiteres angewandt werden. Für  $c$  wurde  $1 \cdot 10^{-3}$  m/l, für  $\varepsilon_1$  der Wert 7500 und für  $\varepsilon_2 = 603$  eingesetzt. Tabelle 6 führt die auf diesem Wege berechneten  $c_1$ -Werte, umgerechnet auf Prozente, für die gemessenen Zwischenstadien an.

Die titrimetrisch gewonnenen Prozente ergaben im Vergleich damit ziemlich abweichende Resultate: Die Titrationsen mit *Tillmans*-Reagens zeigen, wie aus Tabelle 6 ersichtlich, innerhalb der ersten 30 Tage eine wesentlich raschere Umwandlung der Ascorbinsäure an, als aus den Spektrogrammen hervorgeht. Die in diesem Versuchsstadium beobachteten Differenzen zwischen den mit beiden Methoden ermittelten Prozentwerten betragen z. B. zwischen 15. und 20. Tag bis zu 40%. Nach 31 Tagen sank der titrimetrisch gefundene Prozentgehalt der Lösung auf 0% ab, während aus dem Absorptionsspektrum noch die Anwesenheit von nicht umgewandelter Ascorbinsäure hervorging und bis zum 71. Tag beobachtet werden konnte. In diesem Stadium (32. bis 79. Tag) wurde versucht, die mutmaßlich entstandene Dehydroascorbinsäure durch Reduktion mit Schwefelwasserstoff wieder in Ascorbinsäure zu verwandeln, jedoch konnte auch hierdurch titrimetrisch keine Ascorbinsäure gefunden werden. Die Versuchslösung wurde nun zu biologischen Tierversuchen verwendet, wobei sich eindeutig antiskorbutische Wirksamkeit zeigte.

#### c) Stabilisierung mit der wäßrigen Ausschüttelung eines petrolätherischen Extraktes aus Hafermehl.

Wie schon aus einigen Arbeiten bekannt ist, enthalten viele Naturstoffe und tierische Organismen bisher noch wenig bekannte Substanzen, die eine ausgesprochen stabilisierende Wirkung auf Vitamin C ausüben. So stellten *de Caro* und *Giani*<sup>12</sup> einen Oxydationsschutz in tierischen Geweben (Leber, Niere, Skelettmuskel, Blutserum usw.) fest, den sie auf geringe Mengen von Glucon und Glutathion zurückführten. *Griebel* und *Heß*<sup>13</sup> fanden eine Erhöhung der Haltbarkeit der Ascorbinsäure durch Zucker in hohen Konzentrationen und durch Zusatz von Honig. Nach *Sinowjew* und *Besspalova*<sup>14</sup> sind auch im Hafer Stoffe enthalten,

<sup>12</sup> *L. de Caro* und *M. Giani*, Z. physik. Chem. **228**, 13 (1934).

<sup>13</sup> *C. Griebel* und *G. Heß*, Chem. Zbl. **1941 I**, 295.

<sup>14</sup> *Sinowjew* und *Besspalova*, Chem. Zbl. **1941 I**, 1754.

die als wirksame Antioxydantien in Nahrungsmitteln eine Schutzwirkung auf Ascorbinsäure ausüben. Wir versuchten nun, durch Extraktion mit Alkohol, Methylalkohol, Benzol, Aceton und Petroläther aus Hafermehl

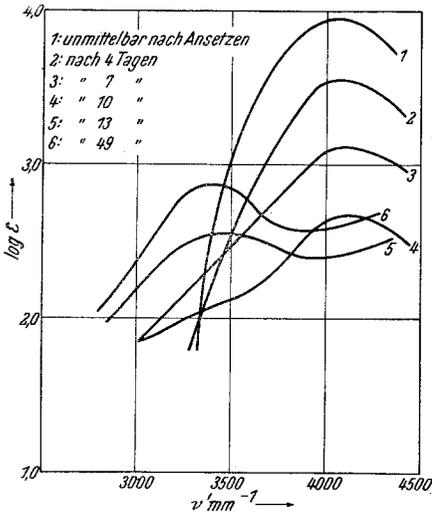


Abb. 7. Stabilisierung mit Haferextrakt.

ein Auszug zu erhalten, der stabilisierende Eigenschaften besitzen, aber auch in optisch klarer Form zur spektrographischen Aufnahme vorliegen sollte. Beide Anforderungen wurden nur von einer wäßrigen Ausschüttelung eines petrolätherischen Extraktes erfüllt.

Der Reaktionsverlauf glich dem vorhergehenden mit Ammonrhodanid: Die Absorption der Ascorbinsäure ließ infolge mitabsorbierender Begleitstoffe ein etwas flacheres Band von  $3300 \text{ mm}^{-1}$  an erkennen, das Maximum lag jedoch unverändert bei  $4120 \text{ mm}^{-1}$ . In raschem Abfall nahm der Ascorbinsäuregehalt bis zum 10. Tag auf 5% ab, nachdem bereits nach 7 Tagen eine Vorbande aufgetreten war. Nach 12 Tagen verschwand das Maximum bei  $4100 \text{ mm}^{-1}$  vollständig, und es trat ein ausgeprägtes Maximum bei  $3390 \text{ mm}^{-1}$  auf, das nach 49 Tagen seinen höchsten Wert von  $\log \epsilon = 2,890$  erreichte (Tabelle 7, Abb. 7). Beim Vergleich der in

der in raschem Abfall nahm der Ascorbinsäuregehalt bis zum 10. Tag auf 5% ab, nachdem bereits nach 7 Tagen eine Vorbande aufgetreten war. Nach 12 Tagen verschwand das Maximum bei  $4100 \text{ mm}^{-1}$  vollständig, und es trat ein ausgeprägtes Maximum bei  $3390 \text{ mm}^{-1}$  auf, das nach 49 Tagen seinen höchsten Wert von  $\log \epsilon = 2,890$  erreichte (Tabelle 7, Abb. 7). Beim Vergleich der in

Tabelle 7.

Zeit in Tagen	Niederfrequentes Band $\nu_{\text{max}} = 3390 \text{ mm}^{-1}$		Hauptband $\nu_{\text{max}} = 4100 \text{ mm}^{-1}$		% Ascorbinsäure	% Ascorbinsäure (titrimetrisch)
	$\log \epsilon_{\text{max}}$	$\epsilon_{\text{max}}$	$\log \epsilon_{\text{max}}$	$\epsilon_{\text{max}}$		
0	—	—	3,95	8913	100	100
4	—	—	3,55	3548	39	87
7	Erste Andeutung		3,11	1288	12	3
10	2,08	120	2,68	479	5	0
13	2,55	355	2,39	246	5	
15	2,61	407	2,42	260	5	
20	2,71	507	2,48	302	5	
24	2,79	617	2,51	320	5	
27	1,84	—	2,57	372	5	
31	2,86	716	2,58	380	5	
37	2,87	741	2,60	398	5	
49	2,89	776	2,60	398	5	
70	2,90	795	2,60	398	5	

den Abb. 6 und 7 dargestellten Kurven fällt ganz offensichtlich eine Ähnlichkeit zwischen den beiden Reaktionen auf: In beiden Fällen weist das Fehlen eines gemeinsamen Kurvenschnittpunktes ebenso wie die fast gleichgroße Endabsorption im entstandenen niederfrequenten Band bei  $3380\text{ mm}^{-1}$  ( $\log \epsilon \sim 3,0$ , also rund dreimal so hoch als bei einer Oxydation durch Luftsauerstoff, Wasserstoffperoxyd, in Gegenwart von  $\text{Cu}^{++}$  oder auf elektrochemischem Wege) darauf hin, daß sich bei beiden Reaktionen der Absorption der Triketoform noch eine weitere Absorption überlagert; die außerdem praktisch identische Wellenzahl der beiden Endmaxima deutet darauf hin, daß auch die stabilisierende Wirkung von Haferextrakten auf die Gegenwart einer reduzierenden Schwefelverbindung zurückzuführen ist. — Die folgende Übersicht zeigt, daß in einem wäßrigen Auszug, wie er für die geschilderte Stabilisierung verwendet wurde, in der Tat schwefelhaltige Eiweißbestandteile mit reduzierender Wirkung, wie Cystin, zugegen sein können.

Nach *Csonka*<sup>15</sup> beträgt der Anteil an lebenswichtigen Aminosäuren in einer Hafersorte („Richland“):

Arginin . . . . .	0,248%	Lysin . . . . .	0,206%
Cystin . . . . .	0,075%	Tryptophan . . . . .	0,030%
Histidin . . . . .	0,075%	Tyrosin . . . . .	1,38%

Die Auswertung der Absorptionskurven auf Prozente Ascorbinsäure erfolgte wieder nach der auf S. 79 entwickelten Formel. Aus Tabelle 7 entnimmt man, daß die Autoxydation viel rascher vor sich geht als beim Ammonrhodanid. Im Vergleich mit den spektrographischen Werten lassen die titrimetrischen einen praktisch konformen Reaktionsverlauf erkennen. Der biologische Tierversuch, der mit der Untersuchungslösung nach 70 Tagen angestellt wurde, ergab eindeutig das Vorhandensein von Vitamin C.

#### d) Stabilisierung mit Metaphosphorsäure.

Als wirksamster Stabilisator erwies sich nun Metaphosphorsäure, deren Schutzwirkung auf Ascorbinsäure erstmalig von *Fujita* und *Ebihara*<sup>16</sup> erkannt worden ist.

Aus einer Reihe von Vorversuchen ergab sich eine Konzentration von 1% Metaphosphorsäure als günstigste. Die Konzentration an Ascorbinsäure wurde wie stets zu  $10^{-3}$  Molen/l gewählt.

Die spektrographische Aufnahme von Ascorbinsäurelösung mit zugesetzter Metaphosphorsäure ergab am 1. Tag die gewohnte Bande

<sup>15</sup> *F. A. Csonka*, Cereal Chem. 18, 523 (1941).

<sup>16</sup> *A. Fujita* und *Ebihara*, Biochem. Z. 290, 172 (1936).

bei  $4100 \text{ mm}^{-1}$  (Abb. 8). Das Spektrum blieb nun 9 Tage lang praktisch unverändert, dann trat eine immer stärker werdende Bande bei  $3300 \text{ mm}^{-1}$  auf, während das Band bei  $4100 \text{ mm}^{-1}$  ständig absank. Nach 59 Tagen war in der Lösung auf spektrographischem Wege keine Ascorbinsäure mehr feststellbar; gleichzeitig erreichte auch die Vorbande bei  $3380 \text{ mm}^{-1}$  ihren höchsten Wert mit  $\log \varepsilon = 2,670$ . Abb. 8 zeigt aber außerdem einen relativ sehr genauen gemeinsamen Schnittpunkt, der den verschiedenen Stadien entsprechenden Absorptionskurven. Dieser Effekt, der hier mit einer bei einem so labilen Stoff wie Ascorbinsäure bemerkenswerten Schärfe zu beobachten ist, läßt sich nun folgendermaßen interpretieren:

Mißt man ganz allgemein von zwei Komponenten A und B das Lösungsspektrum (molarer dekadischer Extinktionskoeffizient  $\varepsilon$  als Funktion von  $\lambda$ , Konzentration  $c_0$  in Molen/l innerhalb des Gültigkeitsbereiches des *Lambert-Beerschen* Gesetzes) und findet man, daß beide Extinktionskurven sich bei der Wellenlänge  $\lambda$  schneiden, so gilt für diese Wellenlänge

$$\varepsilon_{A\lambda} = \varepsilon_{B\lambda} = \varepsilon_\lambda. \quad (1)$$

Bestimmt man nunmehr die Absorptionskurve von beliebigen Mischungen A, B, wobei die Gesamtkonzentration stets konstant gehalten werde,

$$c_A + c_B = c_0, \quad (2)$$

indem zunächst der Modul  $m \left( = -\frac{E}{d} \right)$  als Funktion der Wellenlänge gemessen wird, so setzt sich nach dem Absorptionsgesetz der Modul bei jeder Wellenlänge additiv zusammen zu

$$m = m_A + m_B = \varepsilon_A \cdot c_A + \varepsilon_B \cdot c_B. \quad (3)$$

Für die Schnittpunktwellenlänge  $\lambda$  muß dann nach (1) und (2)  $m_\lambda$  konstant sein, d. h. daß alle Modulkurven einen gemeinsamen Schnittpunkt besitzen werden. Dividiert man den Modul durch die stets konstante Gesamtkonzentration  $c_0$ , also

$$\frac{m}{c_A + c_B} = \varepsilon_A \cdot \frac{c_A}{c_A + c_B} + \varepsilon_B \cdot \frac{c_B}{c_A + c_B}, \quad (4)$$

so erhält man die Extinktionskurve ( $\varepsilon$  als Funktion von  $\lambda$ ) und ersieht sofort, daß sich bei jeder Wellenlänge der erhaltene Extinktionskoeffizient einer Mischung zusammensetzt aus Bruchteilen von  $\varepsilon_A$  und  $\varepsilon_B$ , deren Größe durch den betreffenden Molenbruch gegeben ist. Man erkennt aus (4), daß auch die Extinktionskurven aller Mischungen einen gemeinsamen Schnittpunkt bei der Schnittpunktswellenlänge der Kurven der reinen Komponenten haben werden und daß der Extinktionskoeffizient dieses Schnittpunktes stets  $\varepsilon_\lambda$  betragen wird; ferner, daß die Extinktions-

koeffizienten der Mischungen bei den Wellenlängen der Maxima der reinen Komponenten unmittelbar den im Gemisch vorhandenen Bruchteil der betreffenden Komponente angeben, unter der Voraussetzung, daß die Absorption jeder Komponente im Maximumsgebiet der anderen praktisch zu vernachlässigen ist (weniger als 5% beträgt).

Nummehr erkennen wir aus der Abb. 8, daß der geschilderte Sachverhalt hier offenbar gegeben ist. Wiewohl die Extinktionskurve der reinen Triketoform noch nicht vorliegt,<sup>17</sup> zeigen doch der recht genaue Schnittpunkt der Kurven ebenso wie die im ersten Stadium der Umwandlung befriedigende Übereinstimmung der aus den Spektren sowie aus Titrations ermittelten Prozentgehalte an, *daß sich hier die Ascorbinsäure tatsächlich quantitativ und, ohne einen Zwischenkörper zu bilden, in einen einzigen Stoff umwandelt.*

Außer den im I. Teil näher ausgeführten Hinweisen erlauben vor allem die von *Henri*<sup>18</sup> gemessenen Spektren verschiedener Carbonylverbindungen, das entstandene Maximum bei  $3380 \text{ mm}^{-1}$  einem System von drei miteinander konjugierten CO-Chromophoren zuzuordnen (Tabelle 8). Man erkennt den Einfluß der steigenden Konjugation in einer Rotverschiebung und gleichzeitigen, in erster Näherung proportionalen Extinktionserhöhung, während eine Erhöhung der Zahl an isolierten CO-Gruppen keine wesentliche Verschiebung, sondern lediglich wesentlich verstärkte Absorptionsintensität bewirkt. Die Messung *Henrys* gibt auch einen Anhaltspunkt für die Größe von  $\log \epsilon_{\max}$  der oxydierten

Tabelle 8.

Nummer	Substanz	$\nu_{\max} \text{ mm}^{-1}$	$\log \epsilon_{\max}$	$\epsilon_{\max}$
I	$\begin{array}{c} \text{CH}_3-\text{C}-\text{CH}_3 \\    \\ \text{O} \end{array}$	3697	1,2	15,8
II	$\begin{array}{c} \text{CH}_3-\text{C}-\text{C}-\text{CH}_3 \\    \quad    \\ \text{O} \quad \text{O} \end{array}$	3493	1,45	28
III	$\begin{array}{c} \text{CH}_3-\text{C}-\text{C}-\text{C}-\text{O}-\text{C}_2\text{H}_5 \\    \quad    \quad    \\ \text{O} \quad \text{O} \quad \text{O} \end{array}$	3453	1,73	54,2
IV	$\begin{array}{c} \text{CH}_3-\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}-\text{CH}_3 \\    \qquad \qquad \qquad    \\ \text{O} \qquad \qquad \qquad \text{O} \end{array}$	3693	2,09	124

<sup>17</sup> Es darf hier darauf verwiesen werden, daß diesbezügliche Untersuchungen — in präparativer Hinsicht in Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. A. Zinke — bereits im Gange sind.

<sup>18</sup> *J. Bielecky* und *V. Henri*, Ber. dtsh. chem. Ges. 47, 1712 (1914).

Ascorbinsäure, die gegenüber der Absorption von III (in alkoholischer Lösung) rund siebenmal so stark absorbiert. Eine quantitative Deutung dieses beträchtlichen Unterschiedes steht zur Zeit noch aus.

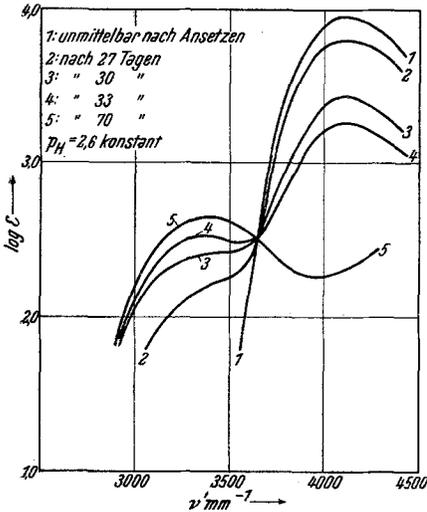


Abb. 8. Stabilisierung mit  $\text{HPO}_3$   
(vgl. Tabelle 9).

Wie Tabelle 9 zeigt, ergänzen sich die Prozente Ascorbinsäure, die aus den bei  $4120 \text{ mm}^{-1}$  gemessenen Extinktionswerten errechnet wurden, mit den Prozenten der oxydierten Form im allgemeinen innerhalb der Fehlergrenze von 10% auf 100%.

Der Titrationsverlauf ergab folgendes Bild: Nach den Prozentwerten, die sich aus den Titrationen ergaben, blieb die Ascorbinsäure 5 Tage lang unverändert erhalten, dann verringerte sich der Gehalt bis zum 31. Tag annähernd gleichsinnig wie bei den spektrographischen Befunden, sank aber dann rasch auf 0% ab, während das Absorptionsspektrum noch einwandfrei die Anwesenheit von Ascorbinsäure und erhebliche

Mengen der Triketoverbindung anzeigte. Als Kriterium wurde wiederum der biologische Tierversuch herangezogen. Nach 35 bis 60 Tagen der Lösung entnommene Proben ergaben einwandfreie antiskorbutische

Tabelle 9.

Tage	Niederfrequentes Band $\nu' = 3330 \text{ mm}^{-1}$		% Dehydroascorbinsäure	Hauptband $\nu' = 4120 \text{ mm}^{-1}$		% Ascorbinsäure	% Ascorbinsäure (titrimetrisch)
	$\log \epsilon_{\text{max}}$	$\epsilon_{\text{max}}$		$\log \epsilon_{\text{max}}$	$\epsilon_{\text{max}}$		
0	—	—	—	3,96	9120	100	100
2	—	—	—	3,95	8913	98	100
7	—	—	—	3,95	8913	98	91
12	—	—	—	3,90	7943	87	78
16	—	—	—	3,82	6531	72	—
21	1,86	72,4	15	3,95	8913	98	—
27	2,18	151	32	3,80	6383	70	—
29	2,40	251	54	3,50	3170	32	40
33	2,53	342	73	3,27	1850	20	0
36	2,55	355	76	3,20	1585	17	0
38	2,61	407	87	3,08	1216	13	0
53	2,65	447	95	3,17	1479	16	0
66	2,67	468	100	2,48	298	3	0
70	2,67	468	100	2,30	199	2	0

Effekte; außer der charakteristischen Gewichtszunahme konnte in Leber, Niere und anderen Organen der seziierten Tiere Ascorbinsäure nachgewiesen werden.

Dieses Ergebnis zeigt, daß die hier allein anwesende oxydierte Form der Ascorbinsäure mit dem der Triketostruktur zugeordneten Maximum bei  $3380\text{ mm}^{-1}$  biologisch reversibel ist. Daraus darf sowohl im vorliegenden Fall, als auch bei den biologisch gleichfalls wirksamen Endprodukten der durch  $\text{CNS}^-$  und Haferextrakt stabilisierten Autoxydation von l-Ascorbinsäure ebenso wie bei der elektrochemisch erhaltenen Triketoform (I. Teil) ein ungeöffneter Laktoring angenommen werden.

Hiermit erscheint die Existenz einer reversibel oxydierten Form von Ascorbinsäure der Konstitution (I) ausreichend belegt. Nach dem Ergebnis des Tierversuches mit der mit  $\text{H}_3\text{PO}_4$  stabilisierten Lösung erscheint es durchaus möglich, daß dies nicht die einzige reversibel oxydierte Form der Ascorbinsäure darstellt und daß etwa eine im untersuchten Spektralbereich praktisch nicht absorbierende hydratisierte Form (vgl. hierzu die Arbeit von Ghosh und Rhakshit<sup>19</sup>) gleichfalls reversibel ist. Der Begriff „Dehydroascorbinsäure“ ist demnach nicht so streng im Sinne von Ghosh und Rhakshit zu fassen und lediglich auf eine nicht absorbierende und daher als hydratisiert angenommene Ascorbinsäure zu beziehen; die vorstehenden Untersuchungen ergeben vielmehr, daß auch eine ganz charakteristisch absorbierende Dehydroascorbinsäure existiert.

### 3. Biologische Testbestimmungen.

Im folgenden seien noch auszugsweise die Ergebnisse der biologischen Tierversuche wiedergegeben. Die biologischen Bestimmungen wurden ebenso wie sämtliche in dieser Arbeit erwähnten Titrationsanalysen von Frau Dr. Renate M. Czmiel durchgeführt, der wir an dieser Stelle für ihre tatkräftige Unterstützung und wertvolle Mitarbeit bestens danken möchten.

Als Versuchstiere wurden ausschließlich Meerschweinchen verwendet. Die quantitative Bestimmung der Ascorbinsäure in den verschiedenen Organen der seziierten Versuchstiere wurden durch Titrations mit Dichlorphenol-Indophenol nach Tillmans mit der bei Bestimmungen an biologischem Material üblichen Methodik<sup>20</sup> durchgeführt. Den Absolutwerten dieser Messungen kommt nun im besonderen nach den Ergebnissen der vorliegenden Untersuchungen gewiß eine ziemliche Unsicherheit zu; doch erscheinen hier in erster Linie die relativen Unterschiede maßgebend, die die biologische Wirksamkeit der verfütterten Lösungen in überzeugender Weise belegen. Aus Tabelle 10 ersieht man außerdem den eindeutigen Vorrang von Hypophyse und besonders Nebenniere im Hinblick auf die Fähigkeit, Ascorbinsäure zu speichern. Wie Tabelle 11 zeigt, ist dies auch nach den Angaben der einschlägigen Literatur<sup>21</sup> beim gesunden Tier der Fall.

<sup>19</sup> J. C. Ghosh und P. C. Rhakshit, Biochem. Z. **299**, 401 (1938).

<sup>20</sup> C. Bomskow, Methodik der Vitaminforschung, Leipzig: Verlag G. Thieme. 1935.

<sup>21</sup> A. Giroud, L'acide ascorbique dans la cellule et les Tissus, Protoplasma-Monographie, Bd. XVI. Berlin: Verlag Bornträger. 1932.

Tabelle 10.

Tier I	Tier II	Tier III	Tier IV	Tier V	
Gewichte der Tiere in Gramm					
400	380	380	420	420	Grundgewichte
166	146	300	180	176	Ende der 14tägigen Mangeldiät (bei III achttägig)
397	330	350	200	—	
22 Tage	37 Tage	14 Tage	16 Tage	—	Nach Verfütterung d. Versuchslösungen
Normales Aussehen			Unter schweren Skorbut- erscheinungen eingegangen		
Milligramm-Prozente Ascorbinsäure					
Gehirn . . . .	4,9	4,0	—	5,3	2,0
Hypophyse	45,8	91,0	76,4	0,0	0,0
Niere . . . . .	7,8	9,0	10,0	2,5	0,1
Nebenniere.	35,2	19,0	71,3	15,5	3,0
Leber . . . . .	12,7	15,0	14,3	4,9	2,0
Darm . . . . .	14,0	8,4	—	2,8	0,0

*Versuche mit der mit Metaphosphorsäure stabilisierten Ascorbinsäurelösung*  
(1%  $\text{HPO}_3$ ,  $10^{-3}$  Mole Ascorbinsäure 11, s. S. 81).

35 Tage nach dem Ansetzen der Lösung wurden je 5 ccm entnommen und an die Tiere I und II verfüttert. Die Lösung zeigte in diesem Stadium etwa das in Abb. 8 mit 4 bezifferte Absorptionsspektrum, demzufolge noch rund 20% der Ausgangsmenge als l-Ascorbinsäure und 80% Dehydroascorbinsäure vorhanden waren, während die Titration mit *Tillmans-*

Tabelle 11.

	mg-% Ascorbinsäure
Gehirn . . . . .	15,7
Hypophyse . . .	138,5
Niere . . . . .	11,0
Nebenniere . . .	120,4
Leber . . . . .	28,6

Reagens 0% Ascorbinsäure ergeben hatte. Dies wurde 3 bzw. 5 Wochen lang fortgesetzt, so daß die dargebotene Lösung praktisch ausschließlich die Triketoform enthielt.

*Versuche mit dem wäßrigen Auszug eines petrolätherischen Extraktes von Hafermehl* (s. S. 79).

Diese Lösung wurde 70 Tage nach dem Ansetzen, also zu einem Zeitpunkt, als die Titration 0% Ascorbinsäure, das Absorptionsspektrum das Endstadium des Triketomaximums ergab, in gleicher Dosierung durch 2 Wochen an Tier III verfüttert. Auch mit der mit Orthophosphorsäure und Ammonrhodanid stabilisierten Ascorbinsäurelösung (vgl. S. 76 und 77) wurden ganz ähnliche Effekte beobachtet. Schließlich gibt Tabelle 10 in den beiden letzten Spalten noch Versuche wieder, die mit Tieren (IV und V)

angestellt wurden, die nach Beendigung der Mangeldiät lediglich mit einer ascorbinsäurefreien Phosphatnährlösung gefüttert bzw. auf Mangelkost belassen wurden.

#### 4. Diskussion und Zusammenfassung der Ergebnisse.

Die absorptionsspektrographische Untersuchung der Autoxydation von Ascorbinsäure unter verschiedenen Bedingungen ergibt erstmalig die Erkenntnis, daß die beschleunigte ebenso wie die verzögerte Autoxydation in wäßriger Lösung keineswegs stets gleichartig verläuft. Abgesehen von den katalysierenden oder stabilisierenden Effekten der verschiedenen Zusätze zeigte es sich, daß die Autoxydation teils zu einer Umwandlung des Ascorbinsäuremoleküls in unterhalb  $4500\text{ mm}^{-1}$  nicht mehr selektiv absorbierende Stoffe führt (bei Gegenwart von  $\text{Fe}^{++}$ -Ion, Bestrahlung mit ultraviolettem Licht, Gegenwart von Orthophosphorsäure); teils führt sie aber, ganz unabhängig davon, ob die Reaktion beschleunigt oder verzögert abläuft, zur Ausbildung einer charakteristischen Vorbande, die mit Sicherheit einem System von drei miteinander konjugierten CO-Gruppen zugeordnet werden konnte. Verbindungen mit dieser Gruppierung können entweder als einziges Oxydationsprodukt entstehen (bei Anwesenheit von Metaphosphorsäure) oder sie entstehen neben anderen gleichfalls absorbierenden Stoffen (z. B. bei Gegenwart von  $\text{Cu}^{++}$ -Ion, Rhodanion sowie eines pflanzlichen Extrakts). Die folgende Tabelle 12 veranschaulicht die bemerkenswerten

Tabelle 12.

Ascorbinsäure oxydiert	Absorptionsband des Oxydationsproduktes		
	$\nu'_{\text{max}}$ $\text{mm}^{-1}$	$\log \epsilon_{\text{max}}$	
mit p-Benzochinon .....	3300	—	vgl. I. Teil
„ $\text{H}_2\text{O}_2$ .....	3370	2,58	vgl. I. Teil
elektrochemisch in salzsaurer Lösung ..	3150	2,56	vgl. I. Teil
durch Luftsauerstoff .....	3370	2,59	
in Gegenwart von $\text{Cu}^{++}$ .....	3300	2,40	
„ „ „ CNS' .....	3380	3,09	} Anwesenheit } mitabsorb. } Begleitstoffe!
„ „ „ Haferextrakt .....	3390	2,89	
„ „ „ $\text{HPO}_3$ .....	3380	2,67	

Übereinstimmung der spektralen Daten dieser Oxydationsprodukte. Im Falle der elektrochemischen Oxydation und der durch  $\text{HPO}_3$ , CNS- und Haferextrakt stabilisierten Autoxydation kann das Vorliegen einer reversiblen Dehydroascorbinsäure der Konstitution I aller Wahrscheinlichkeit nach als erwiesen angesehen werden.

Außer grundsätzlich neuen Aufschlüssen über Zwischen- und Endprodukte bei den verschiedenen Oxydationen ermöglicht das Ultraviolett-

spektrum eine quantitative Verfolgung des Reaktionsverlaufes. Aus diesen Messungen geht hervor, daß  $\text{Cu}^{++}$ -Ion den stärksten katalytischen Effekt zeigt, während die katalytische Wirkung der anderen Faktoren in der Reihenfolge: ultraviolettes Licht,  $\text{Fe}^{++}$ -Ion, Luftsauerstoff abnimmt. Die Wirkung der untersuchten Stabilisatoren nimmt in der Reihenfolge:  $\text{HPO}_3$ ,  $\text{NH}_4$ , CNS, Haferextrakt,  $\text{H}_3\text{PO}_4$  ab.

Die Konzentrationsbestimmungen mit *Tillmans*-Reagens wiesen im allgemeinen einen ähnlichen Verlauf wie die spektrographischen Messungen auf; die einzelnen Werte stimmten jedoch keineswegs mit den spektrographischen überein, worauf auch z. B. *Sosa*<sup>22</sup> hingewiesen hat. Vor allem sprach das *Tillmans*sche Reagens bei geringen Konzentrationen meist nicht mehr an, während im Spektrum noch merkliche Mengen von Ascorbinsäure gefunden wurden, wie auch die Tierversuche zeigten. Abgesehen von der für Ascorbinsäure unspezifischen Reaktion ergibt die Titration mit dem *Tillmans*schen Reagens durch den oft nur sehr unscharf zu beobachtenden Farbumschlag allgemein unsichere und bei geringen Ascorbinsäurekonzentrationen überhaupt keine reproduzierbaren Resultate. Dagegen ermöglicht die objektive absorptionsspektrographische Methodik zuverlässigere und auch wesentlich empfindlichere Messungen; durch die Möglichkeit, den für Ascorbinsäure spezifischen Übergang von Ascorbinsäure in die bei  $3300\text{ mm}^{-1}$  absorbierende, reversibel oxydierte Form quantitativ zu erfassen, gestattet die spektrographische Methodik die Entwicklung eines exakten quantitativen, vor allem aber auch weitgehendst spezifischen Verfahrens. Hierbei ist die Anwendbarkeit auch bei gefärbten Medien ebenso ein erheblicher Vorteil, wie der Umstand, daß bei einem solchen Verfahren eine etwaige vorzeitige teilweise Oxydation durch den Sauerstoff der Luft während der Bestimmung ohne praktischen Einfluß bleiben wird. Über die Methodik selbst soll an anderer Stelle noch ausführlich berichtet werden.

Ich möchte nun vor allem Herrn Prof. Dr. *W. Halden*, der die Leitung des biochemischen Anteils dieser Arbeit innehatte, meinen herzlichen Dank zum Ausdruck bringen sowohl für viele wertvolle Anregungen als auch für die stets hilfsbereite Unterstützung mit Literatur und Substanzen, wodurch die Durchführung vieler wesentlicher Versuche oft überhaupt erst ermöglicht wurde. Ferner bin ich zu Dank verpflichtet Herrn Prof. Dr. *A. Pischinger* für die Leitung der biologischen Tierversuche sowie Herrn Prof. Dr. *O. Kratky* für beratende Diskussionen und das unseren Untersuchungen entgegengebrachte lebhaftes Interesse.

<sup>22</sup> *A. Sosa* und *C. Sosa-Bourdouil*, Bull. Soc. Chim. biol. **25**, 146 (1943).