

Zeitschrift
für
Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung

94. BAND

FEBRUAR 1952

HEFT 2

**Untersuchungen über den oxydativen Abbau
der l-Ascorbinsäure.**

I. Mitteilung.

Vergleichende Untersuchungen über die Kinetik der nicht fermentativen Oxydation
von d-Isoascorbinsäure und l-Ascorbinsäure.

Von

K. E. SCHULTE und ANNELIES SCHILLINGER.

Mitteilung aus der Deutschen Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie,
München.

Mit 9 Textabbildungen.

(Eingegangen am 23. November 1951.)

Vor einigen Jahren berichteten F. J. YOURGA, W. B. ESSELEN jr., und C. R. FELLERS¹ über Untersuchungen, nach denen die Oxydation der d-Isoascorbinsäure (d-Araboascorbinsäure) in gepufferten wäßrigen Lösungen mit größerer Geschwindigkeit verläuft als die der l-Ascorbinsäure. W. B. ESSELEN jr., J. J. POWERS und R. WOODWARD² konnten diesen Befund durch die potentiometrische Messung der Redoxpotentiale der d-Isoascorbinsäure und der l-Ascorbinsäure bei p_H 4,05 (Citratpuffer) bestätigen. Die Autoren schlugen daher die d-Isoascorbinsäure als Antioxydant für die l-Ascorbinsäure vor. Lagerversuche, die mit Tomaten- und Grapefruitsaft (im Grapefruitsaft war der Vitamin-C-Gehalt durch Zugabe von synthetischer Ascorbinsäure erhöht worden) durchgeführt wurden, ergaben, daß der l-Ascorbinsäuregehalt dieser Säfte sich nach 5 bzw. 8 monatiger Lagerzeit nicht veränderte, wenn d-Isoascorbinsäure zugefügt worden war. Bei den Kontrollproben trat in der gleichen Zeit ein Vitamin-C-Verlust von 23,8 bzw. 28,0% auf.

Die Verwendung von Vitamin-C-Schutzstoffen mit dem Ziel einer weitgehenden Erhaltung des natürlich vorkommenden bzw. durch Zugabe von l-Ascorbinsäure angereicherten Vitamin C im Lebensmittel hat nicht nur aus ernährungsphysiologischen Gründen, sondern auch aus lebensmitteltechnologischen an Bedeutung gewonnen, da bei Anwesenheit von l-Ascorbinsäure qualitätsmindernde oxydative Veränderungen verzögert werden. Der Verlauf des oxydativen Abbaues der l-Ascorbinsäure, der durch Schwermetallkatalyse und Fermentwirkung bedingt sein kann, wird durch verschiedene Faktoren beeinflusst. Die Geschwindigkeit der nicht fermentativen Oxydation kann in Gegenwart von Substanzen verzögert sein, wenn diese die Eigenschaft haben, die katalytisch wirksamen Schwermetallionen durch

¹ YOURGA, F. J., W. B. ESSELEN jr. u. C. R. FELLERS: Food Res. 9, 188 (1944).

² ESSELEN jr., W. B., J. J. POWERS u. R. WOODWARD: Ind. Engng. Chem., analyt. Edit. 37, 295 (1945).

titativ verfolgen. Da für die Bestimmung der Dehydroascorbinsäure eine geeignete Methode nicht zur Verfügung steht, verbleibt die Messung des verbrauchten Sauerstoffes, des entstehenden Wasserstoffperoxyds oder der nicht verbrauchten Ascorbinsäure. Nachdem der Sauerstoffverbrauch stets in genau stöchiometrischem Verhältnis erfolgt, kann er zur quantitativen Messung der Reaktion herangezogen werden, vorausgesetzt, daß das Wasserstoffperoxyd nicht mit noch nicht abgebauter Ascorbinsäure reagiert oder in Wasser und Sauerstoff zerfällt. Letztere Reaktion wird bekanntlich durch Kupfer katalysiert. Eine Umsetzung des Wasserstoffperoxyds mit der Dehydroascorbinsäure oder ihren Abbauprodukten, die vor allem in alkalischer Lösung sehr rasch verläuft, beeinflusst das verbrauchte Sauerstoffvolumen nicht. Außerdem muß die Lösung des gasförmigen Sauerstoffes mit genügend großer Geschwindigkeit erfolgen, so daß nicht dieser Vorgang für die Oxydationsreaktion geschwindigkeitsbestimmend wird. Die Messung des Sauerstoffverbrauches ist wiederholt zur Untersuchung des oxydativen Ascorbinsäureabbaus angewendet worden.

K. SINOHARA¹ verfolgte den Verlauf der Reaktion durch jodometrische Bestimmung des Wasserstoffperoxyds. Da die Konzentration des gebildeten Wasserstoffperoxyds sehr niedrig ist und dieser je nach den Versuchsbedingungen weitere Umsetzungen erleidet, erscheint diese Methode wenig geeignet.

Experimentell am einfachsten durchführbar bei gleichzeitig weitgehender Ausschaltung von Fehlermöglichkeiten ist die Messung der Abnahme des Ascorbinsäuregehaltes im Reaktionsgemisch. Diese Methode, die auch den Untersuchungen dieser Arbeit zugrundelag, kann dann zum Studium der Reaktion herangezogen werden, wenn dafür Sorge getragen wird, daß die Konzentration des Sauerstoffes in der Lösung genügend groß ist, so daß nicht letztere zum geschwindigkeitsbestimmenden Faktor der Reaktion wird. Dies kann einmal dadurch erreicht werden, daß ein Sauerstoffstrom durch den Versuchsansatz geleitet wird, außerdem kann die Ascorbinsäurekonzentration so niedrig gewählt werden, daß die molekulare Konzentration des bei der Versuchstemperatur gelösten Sauerstoffes größer als die der Ascorbinsäure ist, also die Sauerstoffkonzentration während des Ablaufs der Reaktion als konstant angesehen werden kann und nur die Konzentration des einen Reaktionspartners, der Ascorbinsäure, sich ändert. Sind diese Verhältnisse gegeben, so müßte sich der Reaktionsverlauf der Ascorbinsäureoxydation bei Gegenwart und Abwesenheit von Schwermetallen als eine Reaktion erster Ordnung beschreiben lassen. Bei 25° C und 760 mm Druck lösen sich in 1000 cm³ Wasser 28,31 cm³ Sauerstoff (reduziert auf 0° C und 760 mm), das entspricht einer molaren Konzentration von $1,26 \cdot 10^{-3}$. Wählt man eine $1 \cdot 10^{-3}$ -molare Ascorbinsäurekonzentration für die Versuchsansätze, so ist — bei gleichzeitigem Durchleiten von Sauerstoff — die Sauerstoffkonzentration in der Reaktionsflüssigkeit ausreichend hoch. Außerdem wird die Reaktion nicht bis zur völligen Oxydation der Ascorbinsäure verfolgt, sondern bis zu Umsätzen von 40—60% der Ascorbinsäure, aus denen sich die Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten hinreichend genau ermitteln lassen. Die Wahl einer niedrigen Ascorbinsäurekonzentration erscheint auch im Hinblick auf die Erfassung der Ascorbinsäure mit Hilfe des TILLMANS-Reagens zweckmäßig, da sonst verhältnismäßig große Volumina an Maßlösung bei relativ kleinen Unterschieden bei den einzelnen Titrationsproben verbraucht werden.

Diese Überlegungen gelten in der gleichen Weise für Untersuchungen mit der d-Isoascorbinsäure, die sich ebenfalls mit 2,6-Dichlorphenolindophenollösung quantitativ erfassen läßt.

I. Angaben über die Versuchsordnung.

Die Versuchsansätze wurden in 300 cm³-Erlenmeyerkölbchen bereitet. Sie enthielten in 50 cm³ bidestilliertem Wasser die d-Isoascorbinsäure bzw. 1-Ascorbinsäure², den Puffer und

¹ SINOHARA, K.: J. Chem. Soc. Japan **61**, 733, 803, 871 (1940).

² Als 1-Ascorbinsäure wurde ein Präparat der Firma Merck (Darmstadt) verwendet, als d-Isoascorbinsäure stand ein Präparat der Firma Hoffmann-La Roche, Inc. (Nutley, New Jersey) zur Verfügung.

Kupfersulfat gelöst. Zunächst wurde der Ansatz ohne l-Ascorbinsäure im Thermostaten auf die Versuchstemperatur erwärmt und dann die ebenfalls auf diese Temperatur erwärmte Lösung der d-Isoascorbinsäure bzw. l-Ascorbinsäure zugefügt. Dabei wurde als Reaktionsbeginn ($t=0$) der Zeitpunkt gewertet, bei dem die Hälfte der l-Ascorbinsäurelösung aus der Pipette in den Versuchsansatz geflossen war. In bestimmten Zeitabständen wurden Proben von 5 cm³ dem Versuchsansatz entnommen und in weiße Porzellanschälchen ($\varnothing = 7$ cm) pipettiert, in denen die weitere Oxydation durch Zusatz von 2 cm³ 10%iger Metaphosphorsäure unterbunden wurde. Die Porzellanschälchen erwiesen sich für die exakte Titration mit 2,6-Dichlorphenolindophenollösung sehr geeignet, da der Umschlagspunkt von farblos auf schwach rosa besser zu erkennen ist als in Glasgefäßen.

Bidestilliertes Wasser wurde mit Hilfe einer elektrisch beheizten Glasapparatur gewonnen. Dieses Wasser enthielt noch im Durchschnitt 1,2 bis 2,0 γ -% Kupfer gelöst. Um diese Kupferspuren zu entfernen, wurde je 1 l Wasser in einer mit Glasstopfen versehenen Flasche von 2 l Inhalt mit 5 cm³ Dithizonlösung (12 mg Dithizon in 100 cm³ Tetrachlorkohlenstoff) 5 min lang kräftig durchgeschüttelt. Das in dieser Weise behandelte Wasser wurde so lange gekocht, bis kein Geruch nach Tetrachlorkohlenstoff mehr feststellbar war und dann unter ständigem Durchleiten von Sauerstoff in feiner Verteilung auf Zimmertemperatur erkalten gelassen.

Auch die verwendeten Puffersubstanzen waren nicht kupferfrei. Sie wurden ebenfalls in der angegebenen Weise mit Dithizonlösung behandelt. Lösungen mit einer höheren p_H -Stufe als 6,8 können nicht in dieser Weise kupferfrei gemacht werden, da bei diesem p_H das Dithizon in die wäßrige Phase überzugehen beginnt. In diesen Fällen wurde in etwas anderer Weise verfahren: Um exakte Angaben über den Kupfergehalt der Versuchsansätze machen zu können, wurde der Kupfergehalt der verwendeten Substanzen bestimmt und durch Zugabe von Kupfersulfatlösung die gewünschte Kupferion-Konzentration im Ansatz eingestellt. Die Bestimmung des Kupfers erfolgte nach der von B. BLEYER, G. NAGEL und J. SCHWAIBOLD¹ für die Untersuchung homöopathischer Zubereitungen ausgearbeiteten „Mischfarbenmethode“.

II. Die Reaktionsordnung der Oxydationsreaktion der d-Isoascorbinsäure.

Der Verlauf der nicht fermentativen Oxydation der l-Ascorbinsäure in wäßrigen Lösungen ist in unterschiedlicher Weise dargestellt worden. So beschreiben E. S. G. BARRON und Mitarbeiter² die Reaktion als Reaktion 0. Ordnung, H. SCHÜMMER³ betrachtet sie als eine „pseudomonomolekulare“ Reaktion; nach R. W. PETERSON und J. H. WALTON⁴ verläuft sie bis zu einem Umsatz von 50—80% als Reaktion 1. Ordnung, A. WEISSBERGER und Mitarbeiter⁵ und ebenso E. SILVERBLATT und Mitarbeiter⁶ und M. A. JOSLYN und J. MILLER⁷ werten ihre Meßergebnisse nach der Gleichung für eine Reaktion 1. Ordnung aus. Über die Reaktionsordnung der Oxydation der d-Isoascorbinsäure liegen unseres Wissens in der Literatur bisher keine Angaben vor.

Zunächst soll der folgende Versuch bei einem p_H -Wert von 5,0 (Phosphatpuffer), der in der oben beschriebenen Weise durchgeführt wurde, näher betrachtet werden. Aus Tab. 1 sind die gewählten Konzentrationen für die d-Isoascorbinsäure, l-Ascorbinsäure, des Kupferions und des Phosphatpuffers zu entnehmen, ebenso die nach bestimmten Zeiten noch vorhandenen Mengen an d-Isoascorbinsäure und l-Ascorbinsäure ($a - x$), berechnet auf den Gesamtansatz.

Die Reaktion verläuft in gleicher Weise, aber mit unterschiedlicher Geschwindigkeit bei beiden Säuren; die d-Isoascorbinsäure wird rascher oxydiert. Berechnet man aus diesen gefundenen Umsätzen die Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten, und zwar einmal als Reaktion 0. Ordnung (k_0 -Werte) und außerdem nach der Gleichung für eine Reaktion 1. Ordnung (k_1 -Werte), so findet man, daß die k_0 -Werte im Verlauf der Reaktion abnehmen, während die k_1 -Werte geringfügig ansteigen und

¹ BLEYER, B., G. NAGEL u. J. SCHWAIBOLD: *Scientia Pharmaceutica* 1939, Augustheft.

² BARRON, E. S. G., R. H. DE MEIO u. F. KLEMPERER: *J. Biol. Chemistry* 112, 625 (1936).

³ SCHÜMMER, H.: *Biochem. Z.* 304, 1 (1940).

⁴ PETERSON, R. W., u. J. H. WALTON: *J. Amer. Chem. Soc.* 65, 1212 (1943).

⁵ WEISSBERGER, A., J. E. LUVALLE u. D. S. THOMAS jr.: *J. Amer. Chem. Soc.* 65, 1934 (1943). — WEISSBERGER, A., u. J. E. LUVALLE: *J. Amer. Chem. Soc.* 66, 700 (1944).

⁶ SILVERBLATT, E., A. L. ROBINSON u. G. S. KING: *J. Amer. Chem. Soc.* 65, 137 (1943).

⁷ JOSLYN, A. M., u. J. MILLER: *Food Res.* 14, 325 (1949).

als fast konstant angesehen werden können. Die kupferkatalysierte Oxydation der d-Isoascorbinsäure und der l-Ascorbinsäure ist also eine Reaktion 1. Ordnung in bezug auf die Konzentration der Säuren. Dies gilt unter den gewählten Versuchsbedingungen dann, wenn die Reaktion im saueren Milieu und bei Anwesenheit einer genügend hohen Kupferkonzentration verläuft. Ist letzteres sehr klein und damit auch die Reaktionsgeschwindigkeit (z. B. in Gegenwart von KCN), dann wird der Verlauf der Reaktion ebenso gut als Reaktion 0. Ordnung wiedergegeben, zumindest bis zu Umsätzen von etwa 50%. Um eine einheitliche Auswertung der Versuche zu ermöglichen, sind aber in allen Versuchen die Reaktionsgeschwindigkeiten nach der Gleichung für die Reaktion 1. Ordnung berechnet worden.

Tabelle 1. Verlauf der Oxydation der d-Isoascorbinsäure und l-Ascorbinsäure.

Versuchsansatz: Konzentration der d-Isoascorbinsäure und der l-Ascorbinsäure $1 \cdot 10^{-3}$ Mol/l, des Puffers $2 \cdot 10^{-2}$ Mol/l (Phosphatpuffer, p_H 5,0), des Kupferions $4,5 \cdot 10^{-5}$ Mol/l. Gesamtvolumen = 50,0 cm³. Temperatur 25° C.

t min	d-Isoascorbinsäure			l-Ascorbinsäure		
	a - x	k ₀	k ₁	a - x	k ₀	k ₁
0	8,60	—	—	8,60	—	—
1	6,61	1,99	0,262	7,15	1,45	0,184
2	5,05	1,78	0,265	5,89	1,41	0,189
4	2,93	1,41	0,270	4,00	1,15	0,191
6	1,64	1,16	0,274	2,66	0,998	0,194
8	—	—	—	1,76	0,855	0,198

III. Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von den Puffersubstanzen, der Kupferion-Konzentration und der Temperatur.

Über den möglichen Einfluß der verwendeten Puffersubstanzen auf die Reaktionsgeschwindigkeit der kupferkatalysierten l-Ascorbinsäureoxydation finden sich in der Literatur schon Hinweise, doch schien es für die vorliegenden Untersuchungen zweckmäßig, mit den verwendeten Puffersubstanzen vergleichende Versuche durchzuführen. In Tab. 2 sind die ermittelten k₁-Werte bei Anwesenheit verschiedener Puffersubstanzen, aber gleicher Konzentration des Kupferions zusammengestellt. Es ist aus diesen Werten ersichtlich, daß der Einfluß des Puffers sehr unterschiedlich ist, und zwar verläuft die Reaktion sowohl der d-Isoascorbinsäure wie auch der l-Ascorbinsäure im Acetat- und Phosphat/Citronensäure-Puffer langsamer als im Phosphatpuffer. Bei einem Vergleich von Meßergebnissen ist dieser Befund zu berücksichtigen.

Tabelle 2. Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Art des Puffers.

Versuchsansatz: Konzentration der d-Isoascorbinsäure und der l-Ascorbinsäure $1 \cdot 10^{-3}$ Mol/l des Puffers $2 \cdot 10^{-2}$ Mol/l, des Kupferions $4,5 \cdot 10^{-5}$ Mol/l. Gesamtvolumen 50 cm³. Temperatur 25° C.

Puffermischung	p _H	K ₁ (min ⁻¹)	
		d-Isoascorbinsäure	l-Ascorbinsäure
Primäres + sekundäres Phosphat	4,0	0,106	0,053
	5,0	0,241	0,166
	6,0	0,420	0,344
	7,0	0,441	0,280
Essigsäure + Natriumacetat	4,0	0,070	0,045
	5,0	0,169	0,127
	6,0	0,251	0,209
	7,0	0,251	0,209
Citronensäure + sec. Natriumphosphat	4,0	0,0175	0,0160
	5,0	0,0270	0,0266
	6,0	0,0362	0,0335
	7,0	0,0374	0,0369

Verfolgt man die Änderung der Reaktionsgeschwindigkeit bei gleichen Puffer-substanzen und gleichem p_H -Wert, aber steigenden Kupferkonzentrationen, so findet man, daß die Reaktionsgeschwindigkeit mit steigenden Kupferkonzentrationen linear zunimmt (Abb. 1).

Bei p_H 4,0 und 5,0 verläuft die Oxydation der d-Isoascorbinsäure rascher als die der l-Ascorbinsäure. Das Verhältnis der k_1 -Werte der beiden Säuren ist bei p_H 4,0 2:1, bei p_H 5,0 ist es 1,3:1; dieses bleibt mit steigenden Kupferkonzentrationen gleich, der meßbare Unterschied wird aber größer und damit analytisch leichter erfaßbar.

Diese Tatsache muß bei der Festlegung der Versuchsbedingungen (Kupferkonzentration) einer vergleichenden Untersuchung über die Reaktionsgeschwindigkeit der

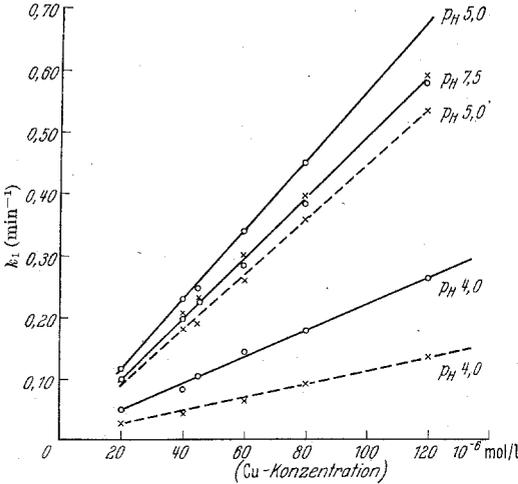


Abb. 1. Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit der Oxydation der d-Isoascorbinsäure (—○—) und der l-Ascorbinsäure (—x—) von der Kupferionkonzentration. Konzentration der d-Isoascorbinsäure und der l-Ascorbinsäure $1 \cdot 10^{-3}$ Mol/l, des Puffers $2 \cdot 10^{-2}$ Mol/l. Temperatur 25° C.

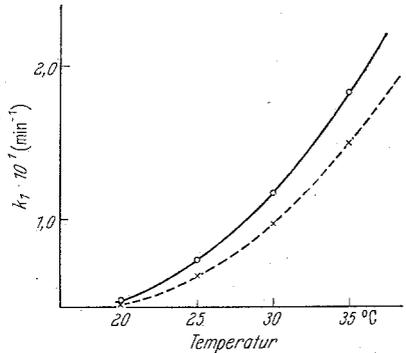


Abb. 2. Abhängigkeit der Oxydation der d-Isoascorbinsäure (—○—) und der l-Ascorbinsäure (—x—) von der Temperatur. Konzentration der d-Isoascorbinsäure und der l-Ascorbinsäure $1 \cdot 10^{-3}$ Mol/l, des Puffers $2 \cdot 10^{-2}$ Mol/l (Phosphatpuffer, p_H 5,0), des Kupferions $1,5 \cdot 10^{-5}$ Mol/l.

Oxydation der beiden Säuren berücksichtigt werden. Bei p_H 7,5 sind die k_1 -Werte für beide Säuren bei den berücksichtigten Kupferkonzentrationen gleich groß, sie liegen auf einer gemeinsamen Geraden.

Eine Erhöhung der Temperatur bei sonst gleichen Versuchsbedingungen hat eine Zunahme der Reaktionsgeschwindigkeit zur Folge (Abb. 2).

Bei einer Zunahme der Temperatur um 10° C erhöht sich die Geschwindigkeit der Reaktion um das $2-2\frac{1}{2}$ fache. Die Berechnung der zugehörigen Aktivierungsenergie Q der ARRHENIUSSchen Gleichung $k = \alpha e^{-Q/RT}$ nach der Gleichung

$$Q = R \cdot \frac{T_1 \cdot T_2}{T_1 - T_2} \cdot \ln \frac{k_1}{k_2}$$

aus den ermittelten k_1 -Werten bei 25° bzw. 35° C ergibt für die d-Isoascorbinsäure $Q = 16,2$ kcal, für die l-Ascorbinsäure $Q = 15,3$ kcal.

IV. Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von dem p_H -Wert der Lösung.

Wird der Verlauf der Oxydationsreaktion der d-Isoascorbinsäure und der l-Ascorbinsäure bei verschiedenen p_H -Stufen, aber gleicher Konzentration des Kupferions, untersucht, so findet man, daß die Umsätze pro Zeiteinheit je nach der

p_H -Stufe verschieden sind. In Abb. 3 ist der Verlauf der Reaktion für d-Isoascorbinsäure und l-Ascorbinsäure bei einigen p_H -Stufen graphisch dargestellt, und zwar ist $\log(a-x)$ als Funktion der Zeit aufgetragen. Die graphisch ermittelten Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten für den Beginn der Reaktion sind in Tab. 3 zusammengestellt. Aus diesen Werten ist ersichtlich, daß die Reaktionsgeschwindigkeit sowohl bei der d-Isoascorbinsäure wie auch bei der l-Ascorbinsäure mit steigendem p_H -Wert bis zum p_H 6,0 zunimmt, dann zwischen p_H 6,0 und p_H 7,0 etwas abfällt und anschließend im schwach alkalischen Gebiet wieder ansteigt. Das Verhältnis der k_1 -Werte der beiden Säuren im p_H -Bereich 3,0—4,5 ist 2:1 und verschiebt sich dann mit steigendem p_H -Wert immer mehr nach 1:1; ab p_H 7,5 sind die k_1 -Werte gleich.

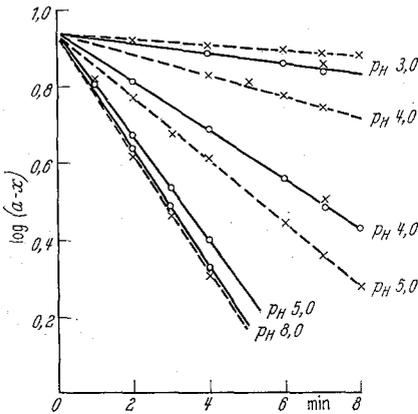


Abb. 3. Verlauf der Oxydation der d-Isoascorbinsäure (—o—) und der l-Ascorbinsäure (—x—) bei verschiedenen p_H -Stufen (Phosphatpuffer). Konzentration des Kupferions: $4,5 \cdot 10^{-5}$ Mol/l. Temperatur 25° C.

der beiden Säuren im p_H -Bereich 3,0—4,5 ist 2:1 und verschiebt sich dann mit steigendem p_H -Wert immer mehr nach 1:1; ab p_H 7,5 sind die k_1 -Werte gleich.

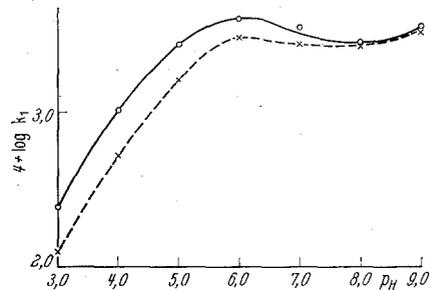


Abb. 4. Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit der kupferkatalysierten Oxydation der d-Isoascorbinsäure (—o—) und der l-Ascorbinsäure (—x—) von der H-Ion-Konzentration. Konzentration des Kupferions: $4,5 \cdot 10^{-5}$ Mol/l. Temperatur 25° C.

Tabelle 3. Die k_1 -Werte für die kupferkatalysierte Oxydation der d-Isoascorbinsäure und der l-Ascorbinsäure bei verschiedenen p_H -Stufen.

Versuchsansatz: Konzentration der d-Isoascorbinsäure und der l-Ascorbinsäure $1 \cdot 10^{-3}$ Mol/l, des Puffers $2 \cdot 10^{-2}$ Mol/l, des Kupferions $4,5 \cdot 10^{-5}$ Mol/l. Gesamtvolumen $50,0$ cm³. Temperatur 25° C.

Puffer	p_H	$k_1 \cdot 10^4$ (min ⁻¹)	
		d-Isoascorbinsäure	l-Ascorbinsäure
$H_3PO_4 + Na_2HPO_4$	3,0	240,0	120,0
	3,5	502,0	250,0
	4,0	1050,0	530,0
$KH_2PO_4 + Na_2HPO_4$	4,5	1740,0	955,0
	5,0	2410,0	1660,0
	5,5	3550,0	2560,0
	6,0	4200,0	3340,0
	6,5	3900,0	2880,0
	7,0	3410,0	2800,0
	7,5	2800,0	2860,0
	8,0	2900,0	2900,0
$Na_2CO_3 + NaHCO_3$	8,5	2990,0	3000,0
	9,0	3830,0	3630,0

Die graphische Darstellung (Abb. 4) veranschaulicht die Änderung der Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der H-Ion-Konzentration noch besser, und zwar sind die Logarithmen der k_1 -Werte als Funktion des p_H -Wertes eingezeichnet. Die beiden Kurven verlaufen bis zu einem Maximum bei p_H 6,0 fast parallel, um sich

dann auf dem absteigenden Ast zu nähern und ab p_H 7,5 liegen die Werte auf einer gemeinsamen Kurve, die im schwach alkalischen Gebiet wieder ansteigt. Im gesamten sauren Gebiet wird demnach die d-Isoascorbinsäure rascher als die l-Ascorbinsäure oxydiert, allerdings ändert sich der Unterschied in den Reaktionsgeschwindigkeiten etwas mit der H-Ion-Konzentration.

Um eine Vorstellung über den Verlauf der Oxydation der beiden Säuren bei Ausschaltung der Kupferkatalyse, aber sonst gleichen Versuchsbedingungen zu gewinnen, wurden die gleichen Versuchsreihen ohne Zusatz von Kupferionen durchgeführt. Zur Ausschaltung des katalytischen Einflusses der in bidestilliertem Wasser

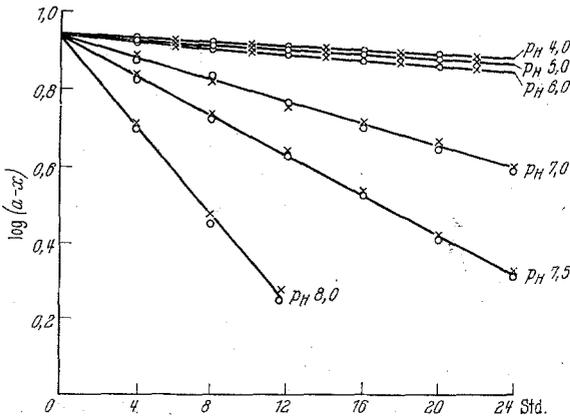


Abb. 5. Abnahme der d-Isoascorbinsäure und der l-Ascorbinsäure bei einigen p_H -Stufen. (Die Meßdaten für beide Säuren liegen auf gemeinsamen Kurven, o = Meßdaten für die d-Isoascorbinsäure, x = Meßdaten für die l-Ascorbinsäure.) Temperatur $25^\circ C$.

enthaltenen bzw. durch die Puffersubstanzen eingeschleppten Schwermetallspuren (das bidestillierte Wasser und die Pufferlösungen der Versuchsansätze wurden nicht durch Ausschütteln mit Dithizonlösung kupferfrei gemacht) wurde der Reaktionsverlauf in Gegenwart von Kaliumcyanid (0,01—0,001 Mol/l) gemessen. Außerdem wurde die gleiche Reaktion unter Verwendung von mit Dithizon ausgeschütteltem Wasser und Pufferlösungen untersucht.

Die sehr langsam verlaufende Reaktion ist ebenfalls eine Reaktion 1. Ordnung. In Abb. 5 sind die Logarithmen der nach bestimmten Zeiten noch vorhandenen

Mengen an d-Isoascorbinsäure und l-Ascorbinsäure ($a - x$) bei einigen p_H -Stufen als Funktion der Zeit aufgetragen; die erhaltenen Kurven sind Gerade, die für d-Isoascorbinsäure und l-Ascorbinsäure praktisch zusammenfallen.

Die bei den verschiedenen p_H -Stufen ermittelten Werte für k_1 sind in der Tab. 4 zusammengestellt. Die Reaktionsgeschwindigkeiten beider Säuren sind unter diesen Versuchsbedingungen in dem berücksichtigten p_H -Bereich gleich groß, ein meßbarer Unterschied außerhalb der Fehlergrenze konnte nicht gefunden werden. Dieser Befund stimmt mit der in Abb. 2 wiedergegebenen Änderung der Reaktionsgeschwindigkeit mit der Kupferkonzentration überein, die in dieser Abbildung wiedergegebenen Kurven nähern sich mit der Abnahme der Kupferkonzentration immer mehr.

In Abb. 6 stellen die Kurven die Änderung der Reaktionsgeschwindigkeit in Gegenwart von Kaliumcyanid bzw. nach Behandlung der verwendeten Reaktionslösungen mit Dithizon dar.

Die k_1 -Werte für die d-Isoascorbinsäure und die l-Ascorbinsäure liegen auf einer gemeinsamen Kurve. Die Reaktionsgeschwindigkeit der Oxydation beider Säuren in Gegenwart von Kaliumcyanid ändert sich mit steigendem p_H bis zu einem Wert von 6,0—6,5 nur sehr wenig, um dann im alkalischen Bereich rasch anzusteigen. Einen ähnlichen Kurvenverlauf zeigt die Änderung der Reaktionsgeschwindigkeit, wenn die Versuchsansätze durch Behandlung mit Dithizon kupferfrei gemacht wurden, allerdings läßt sich dann die Reaktion nur bis zu einem p_H -Wert von 7,0 verfolgen. Den Unterschieden in den k_1 -Werten (in Gegenwart von KCN bzw. nach Vorbehandlung mit Dithizon) ist keine Bedeutung beizumessen; sie sind bedingt

Tabelle 4. Die k_1 -Werte für die Autoxydation der d-Isoascorbinsäure und der l-Ascorbinsäure bei verschiedenen p_H -Stufen, sowie die berechneten k_1 (Cu)-Werte für die wirkliche Kupferkatalyse.

Versuchsansatz: Konzentration der d-Isoascorbinsäure und der l-Ascorbinsäure $1 \cdot 10^{-3}$ Mol/l, des Puffers $2 \cdot 10^{-2}$ Mol/l, des Kaliumcyanids $1,0-10,0 \cdot 10^{-3}$ Mol/l. Gesamtvolumen $50,0 \text{ cm}^3$. Temperatur 25° C .

Puffer	pH	$k_1 \cdot 10^4 \text{ (min}^{-1}\text{)}$				$k_1 \text{ (Cu)} \cdot 10^4 \text{ (min}^{-1}\text{)}$	
		Bei Gegenwart von KCN		Nach Vorbehandlung mit Dithizon		d-Isoasc.	l-Asc.
		d-Isoasc.	l-Asc.	d-Isoasc.	l-Asc.		
$\text{H}_3\text{PO}_4 + \text{Na}_2\text{HPO}_4$	3,0	1,001	1,052	—	—	239,0	118,95
	3,5	1,032	1,021	—	—	500,97	248,98
	4,0	1,046	1,035	0,247	0,234	1048,95	528,97
$\text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{Na}_2\text{HPO}_4$	4,5	1,252	1,141	0,302	0,367	1738,75	953,86
	5,0	1,392	1,230	0,463	0,400	2408,61	1658,77
	5,5	1,602	1,547	0,502	0,491	3548,40	2558,45
	6,0	1,799	1,772	0,710	0,620	4198,20	3339,23
	6,5	2,298	2,240	1,406	1,632	3897,70	2877,76
	7,0	3,926	3,760	2,799	2,801	4406,07	2796,84
	7,5	11,00	11,57	—	—	2789,00	2848,43
$\text{Na}_2\text{CO}_3 + \text{NaHCO}_3$	8,0	21,04	22,95	—	—	2878,96	2878,05
	8,5	44,25	41,10	—	—	2945,75	2978,90
	9,0	94,15	83,00	—	—	3735,85	3547,00

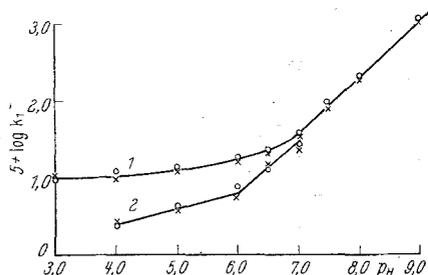


Abb. 6. Änderung der Reaktionsgeschwindigkeit der kupferkatalysierten Oxydation der d-Isoascorbinsäure (—○—) und l-Ascorbinsäure (—x—) mit der H-Ion-Konzentration in Gegenwart von Kaliumcyanid (1) bzw. nach Behandlung mit Dithizon (2).

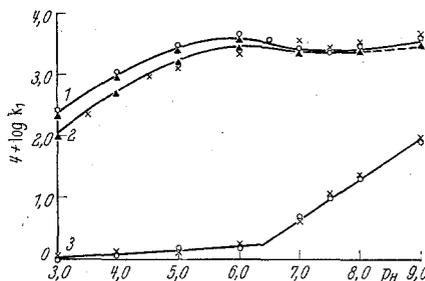


Abb. 7. Änderung der Reaktionsgeschwindigkeit der Oxydation der d-Isoascorbinsäure (1) und der l-Ascorbinsäure (2) in Abhängigkeit von der Wasserstoffion-Konzentration in Gegenwart und bei Abwesenheit von Kupferionen (3). ○ = Meßdaten der d-Isoascorbinsäure, x = Meßdaten der l-Ascorbinsäure, ▲ = die berechneten k_1 (Cu)-Werte.

durch die Fehlergrenze der Bestimmungsmethode, die sich bei den geringen Umsätzen dieser Messungen stärker bemerkbar macht. In den folgenden Ausführungen wird die Oxydation der beiden Säuren in Gegenwart von KCN bzw. in mit Dithizon kupferfrei gemachten Lösungen als Autoxydation bezeichnet.

In Abb. 7 sind die Kurven für die Reaktionsgeschwindigkeit der d-Isoascorbinsäure und der l-Ascorbinsäure als Funktion der Wasserstoffion-Konzentration in Gegenwart und bei Abwesenheit von Kupferionen noch einmal in einem anderen Maßstab aufgetragen.

Durch diese Darstellung wird deutlich, daß die Geschwindigkeit der kupferkatalysierten Oxydation bis zu einem p_H -Wert von 6,0 sehr rasch zunimmt, während sich im gleichen p_H -Bereich die Geschwindigkeit der Autoxydation der beiden Säuren nur sehr wenig ändert. Erst im schwach alkalischen Gebiet gewinnt der Anteil der Autoxydation an dem oxydativen Abbau der d-Isoascorbinsäure und der

l-Ascorbinsäure, verglichen mit der kupferkatalysierten Oxydation, die im schwach alkalischen Gebiet nicht im gleichen Maße zunimmt, an Bedeutung.

Nimmt man an, daß beide oxydativen Vorgänge, Autoxydation und kupferkatalysierte Oxydation, nebeneinander ablaufen, so ergibt erst die Differenz der k_1 -Werte beider Reaktionen eine Vorstellung über die Reaktionsgeschwindigkeit der wirklichen kupferkatalysierten Reaktion. Diese Werte für die Reaktionsgeschwindigkeit der wahren kupferkatalysierten Oxydation wurden mit k_1 (Cu) bezeichnet; sie finden sich in Tab. 4 zusammengestellt und in Abb. 7 eingezeichnet. Sie fallen praktisch mit der Kurve der k_1 -Werte der kupferkatalysierten Reaktion bis zu einem p_H -Wert von 7,5 zusammen, bei höheren p_H -Werten wird der Anteil der Autoxydation an der Oxydation der beiden Säuren deutlicher bemerkbar. (Die Kurve der k_1 (Cu)-Werte ist gestrichelt gezeichnet.)

W. D. KÜMLER und T. C. DANIELS¹ haben 1935 die Dissoziationskonstanten der zweibasischen l-Ascorbinsäure bestimmt: $p_{K_1} = 4,12$ ($K_1 = 7,56 \cdot 10^{-5}$), $p_{K_2} = 11,51$ ($K_2 = 3,08 \cdot 10^{-12}$). Für die zweibasische d-Isoascorbinsäure fand G. CARPENT² $p_{K_1} = 4,23$ ($K_1 = 5,89 \cdot 10^{-5}$), p_{K_2} zwischen 11 und 12. Der von G. CARPENT mitgeteilte Wert dürfte sich bei einer Nachprüfung vielleicht noch etwas ändern, da scheinbar ein nicht ganz sauberes Präparat zur Verfügung stand (angegebener Smp. 164° C, Smp. der reinen Säure 174° C).

Mit Hilfe dieser Werte läßt sich berechnen, welcher Anteil der beiden Säuren als einwertiges Ion (AH^-) bzw. als zweiwertiges Ion (A^{--}) bei den verschiedenen p_H -Stufen vorliegt, und zwar nach folgenden Gleichungen:

$$AH^- = \frac{K_1 [1/H^-]}{1 + K_1 [1/H^-]} - \frac{K_2 [1/H^-]}{1 + K_2 [1/H^-]};$$

$$A^{--} = \frac{K_1 [1/H^-]}{1 + K_1 [1/H^-]} \cdot \frac{K_2 [1/H^-]}{1 + K_2 [1/H^-]}.$$

Da der K_2 -Wert für die d-Isoascorbinsäure nicht genau bestimmt ist, läßt sich diese Berechnung für die d-Isoascorbinsäure nicht exakt durchführen, doch darf wohl die Annahme gemacht werden, daß auch die K_2 -Werte der beiden Säuren nahe beieinanderliegen (für d-Isoascorbinsäure $p_{K_2} = 11,62$ angenommen). Graphisch dargestellt erhält man die Dissoziationskurven der d-Isoascorbinsäure und der l-Ascorbinsäure, die parallel miteinander laufen (Abb. 8).

Um den Neutralpunkt liegen die l-Ascorbinsäure (p_H 7,12) und die d-Isoascorbinsäure (p_H 7,23) vollständig als einwertige Ionen vor, im alkalischen Gebiet als zweiwertige Säurereste. Nach A. WEISSBERGER und J. E. DUVALLE³, die die gleichen Betrachtungen für den Verlauf der Oxydation der l-Ascorbinsäure anstellten, läßt sich der Anteil des monovalenten Ions der d-Isoascorbinsäure bzw. der l-Ascorbinsäure aus der Geschwindigkeit der kupferkatalysierten Oxydation berechnen, indem man die Werte für die Reaktionsgeschwindigkeit der wirklichen Kupferkatalyse [k_1 (Cu)] durch den bei den zugehörigen p_H -Stufen vorhandenen Anteil an einbasischem Ion dividiert; man erhält beinahe konstante Werte [k_1 (AH^-)] für die Reaktionsgeschwindigkeit, deren Logarithmen als Funktion der p_H -Werte aufgetragen, für beide Säuren Kurven ergeben (Abb. 9), die fast parallel zur Abszisse verlaufen. Das bedeutet aber, daß allein das monovalente Ion der beiden Säuren und nicht die undissoziierten Säuren oder das divalente Ion Gegenstand der kupferkatalysierten Oxydation ist.

Anders verläuft die Autoxydation; bis p_H 6,5 (Abb. 7) ändert sich die Reaktionsgeschwindigkeit mit steigendem p_H -Wert und damit steigendem Anteil am monovalenten Säure-Ion nicht bzw. nur sehr wenig, im alkalischen Gebiet steigt die

¹ KÜMLER, W. D., u. T. C. DANIELS: J. Amer. Chem. Soc. **57**, 1929 (1935).

² CARPENT, G.: C. r. Séances Acad. Sci. **206**, 1816 (1938).

³ WEISSBERGER, A., u. J. E. DUVALLE: J. Amer. Chem. Soc. **66**, 700 (1944).

Reaktionsgeschwindigkeit rasch an. Es wird also offenbar das zweiwertige Ion der beiden Säuren mit viel größerer Geschwindigkeit autoxydiert als das einwertige. Zu diesem Ergebnis kommen auch A. WEISSBERGER und Mitarbeiter¹. Die Autoren bestimmten die Geschwindigkeit der Sauerstoffaufnahme von l-Ascorbinsäure in Gegenwart von Kaliumcyanid in einem p_H -Bereich von 4,7—9,2. Sie schließen aus ihren Meßdaten, daß sowohl das einbasische wie auch das zweibasische Ion der l-Ascorbinsäure an der Reaktion teilnimmt, daß aber das zweiwertige Ion 10^5 mal schneller als das einwertige mit Sauerstoff reagiert. Wurde der Partialdruck des Sauerstoffs auf $\frac{1}{5}$ erniedrigt, so änderte sich die Reaktionsgeschwindigkeit des zweibasischen Ions proportional der Sauerstoffkonzentration, nicht aber die des

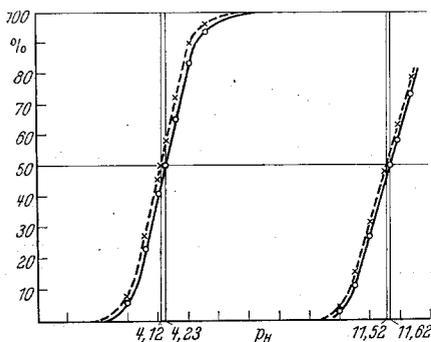


Abb. 8. Dissoziationskurven der d-Isoascorbinsäure (—○—) und der l-Ascorbinsäure (—x—).

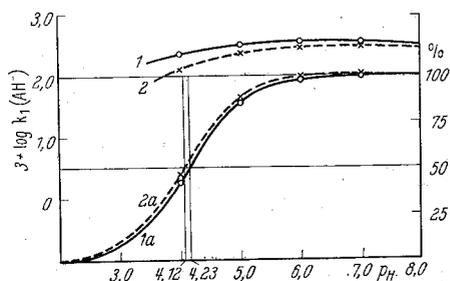


Abb. 9. Die berechneten $k_1(AH^-)$ -Werte der d-Isoascorbinsäure (1) und der l-Ascorbinsäure (2) als Funktion der Wasserstoffion-Konzentration dargestellt; die zugehörigen Dissoziationskurven des einwertigen Säureions der beiden Säuren sind darunter gezeichnet (1a/2a).

einbasischen l-Ascorbinsäureions. Dieser Befund führte die Autoren zu der Annahme, daß das einbasische l-Ascorbinsäureion an einer Zwischenreaktion teilnimmt, die für die Reaktionsgeschwindigkeit der Autoxydation des einbasischen Ions geschwindigkeitsbestimmend ist.

Zusammenfassung.

Die kupferkatalysierte Oxydation der d-Isoascorbinsäure verläuft in einem p_H -Bereich unter 7,5 in gleicher Weise aber mit größerer Geschwindigkeit als die der l-Ascorbinsäure. Die Beeinflussung der Reaktionsgeschwindigkeit durch gleichzeitig anwesende Puffersubstanzen, eine Temperaturerhöhung oder eine Änderung der Kupferkonzentration ist bei beiden Säuren gleichsinnig. Im schwach alkalischen Gebiet konnte unter den gewählten Versuchsbedingungen kein meßbarer Unterschied der Reaktionsgeschwindigkeit beobachtet werden. Bei sehr niedrigen Kupferkonzentrationen (in Gegenwart von Kaliumcyanid bzw. nach Vorbehandlung der Reaktionslösungen mit Dithizonlösung) konnten keine Unterschiede der Reaktionsgeschwindigkeit für die beiden Säuren unter den gewählten Versuchsbedingungen gemessen werden.

Nur das einwertige Ion der beiden Säuren — nicht das zweiwertige Ion bzw. die undissoziierte Säure — nimmt an der kupferkatalysierten Oxydation teil, während die Oxydation des zweiwertigen Ions der Säuren (im alkalischen Gebiet) nicht durch Kupferkatalyse bedingt sein kann.

Das Ergebnis bestätigt die von W. B. ESSELEN jr., J. J. POWERS und R. WOODWARD beschriebene Beobachtung, daß die nicht fermentative Oxydation der l-Ascorbinsäure durch gleichzeitig anwesende d-Isoascorbinsäure verzögert und letztere gegenüber der l-Ascorbinsäure als Antioxydans wirksam werden kann.

¹ WEISSBERGER, A.: Zit. S. 80, Anm. 5.