

ZUSAMMENFASSUNG

Die Knollen von *Raphionacme burkei* N. E. BR. enthalten ein Gemisch von Ester-glykosiden, von denen bisher keines in unversehrter Form rein isoliert wurde. Sie werden von Säuren und Alkalien leicht angegriffen und enthalten zahlreiche Zucker, darunter reichlich D-Glucose. Ein teilweiser Abbau war auf fermentativem Wege oder durch milde saure Hydrolyse möglich. Bei letzterer erfolgte die Spaltung teilweise bis zur Geninstufe. Von den freigesetzten Zuckern bestand nur ein sehr kleiner Teil aus Monosacchariden, wobei sich papierchromatographisch Cymarose, Olean-drose, Digitoxose und Boivinose nachweisen liessen. Die Hauptmenge bestand aus Di- und Tri-sacchariden, vermutlich waren auch Tetrasaccharide anwesend. Diese Oligosaccharide bestanden vorwiegend aus D-Glucose, daneben waren nach Spaltung papierchromatographisch Xylose und Digitalose nachweisbar. Aus den bei der sauren Hydrolyse erhaltenen chloroformlöslichen Anteilen liessen sich vier krist. Stoffe (Genin JB 9 und die drei Glykoside JB 11, JB 15 und JB 20) isolieren. Papierchromatographische Resultate deuten darauf hin, dass beim Kochen des Glykosids JB 15 mit Alkali der ganze Zucker unter Bildung des Genins JB 9 abgespalten wird. Das Genin JB 9 wird aber von Alkali auch langsam weiter angegriffen. Nach vorläufigen Resultaten enthält es ein polycyclisches Grundgerüst. Das Glykosid JB 11 lieferte mit Alkali 4 Säuren, vermutlich Essigsäure, Angelicasäure, β,β -Dimethylacrylsäure (oder Tiglinsäure) und eine Hydroxyvaleriansäure.

Organisch-chemische Anstalt der Universität Basel

246. Die anti- und prooxydative Wirkung von Äthylendiamin-tetracetat (EDTA) und Propylgallat auf metallkatalysierte Oxydationen in verschiedenen Puffern

von C. Flesch, W. Schuler und R. Meier

(24. VIII. 60)

TANNER¹⁾ hat die Autoxydation und metallkatalysierte Oxydation verschiedener autoxydabler Substanzen untersucht, sowie die Wirkung bestimmter Chelatbildner auf diese Oxydationssysteme. Es wurde gefunden, dass bereits die Änderung der Pufferkonzentration (Phosphatpuffer) die Stärke der Katalyse verändert. Versuche von TANNER, SCHULER und MEIER²⁾ zeigten ferner, dass einzelne Komplexbildner, die im allgemeinen hemmen, im $M/2$ Phosphatpuffer nach SÖRENSEN Metallkatalysen, aber auch die Autoxydation bestimmter Substrate verstärken können. Die von UDENFRIEND *et al.*³⁾ gemachte Beobachtung, dass EDTA die Fe^{+++} -katalysierte Ascorbinsäureoxydation im Phosphatpuffer fördert, wurde bestätigt, und weitere Beispiele derartiger Reaktionsumkehr wurden festgestellt.

¹⁾ E. TANNER, Dissertation, Bern 1958.

²⁾ E. TANNER, W. SCHULER & R. MEIER, *Helv.* **42**, 445 (1959).

³⁾ S. UDENFRIEND, C. T. CLARK, J. AXELROD & B. B. BRODIE, *J. biol. Chemistry* **208**, 731 (1954).

Auf Grund dieser Befunde schien es erwünscht, die Bedeutung von Puffersubstanzen für die Stärke und Art katalytischer Reaktionen eingehender zu studieren. Wenn solche in der Tat den Verlauf katalytischer Reaktionen bereits in charakteristischer Weise beeinflussen können, so hat dies für die Beurteilung chemischer und enzymatischer Reaktionen unter analogen Modifikationen wesentliche Wichtigkeit.

Versuche von FLESC⁴⁾ haben gezeigt, dass bei Autoxydationen und metallkatalysierten Oxydationen die Art des Puffers eine Rolle spielt. Bei Konstanthaltung der anderen Reaktionsbedingungen und ausschliesslicher Änderung der Art des Puffers wurden unerwartete Befunde erhoben. Die Änderungen der Reaktionen konnten mit chemischen und physikochemischen Eigenschaften der einzelnen Reaktionsbestandteile nicht ohne weiteres erklärt werden; es wurde deshalb angenommen, dass dabei ein «Komplexverhalten» aller Komponenten massgebend ist. Auch Puffersubstanzen können als Komplexbildner angesehen werden. Es besteht somit die Möglichkeit einer verschiedenartigen Komplexbildung und damit einer verschiedenen Oxydation des gleichen Substrates mit dem gleichen Metall in verschiedenen Puffern. Die Zugabe weiterer Komponenten, z. B. Chelatbildner, zum Reaktionsgemisch vermehrt die möglichen Variablen und kann weitere Änderungen in der katalytischen oder Hemm-Wirkung der Metalle bzw. Metallchelate verursachen. In Erweiterung der Untersuchungen von TANNER²⁾ wird im folgenden über neue charakteristische Varianten der milieuabhängigen Änderung katalytischer Reaktionen berichtet werden.

Methodik. – Die Oxydation der Substrate wurde auf Grund des O₂-Verbrauches manometrisch nach WARBURG gemessen. Das Hauptgefäss enthielt 1,8 ml Pufferlösung pH 7,7, das Substrat und evtl. auch den Chelatbildner. Im Anhang war das Metallsalz (Chlorid oder Sulfat) in 0,2 ml bidestilliertem Wasser gelöst. Das Gesamtvolumen war 2,0 ml. Gas: Luft; Temp. 37°. Temperatenausgleich 20°. Alle Lösungen wurden mit aus Glas doppeltdestilliertem Wasser hergestellt. Als Puffer wurden m/2 Phosphatpuffer, Imidazol-, Collidin-, Tris- und Veronal/HCl-Puffer verwendet. Die Substrat-EK. im Hauptgefäss war bei Ascorbinsäure und Adrenalinhydrogentartrat m/200, bei Linolsäure m/50. Als Chelatbildner wurden Komplexon III (EDTA = Äthylen-diamin-tetraessigsäure, Dinatriumsalz) und Propylgallat (Tenox PG, KODAK) gewählt, EK m/200. Immer wurden 0,1 mg/ml Metallsalz verwendet und zwar CuCl₂·2H₂O, FeSO₄·7H₂O, MnCl₂·4H₂O, CoCl₂·6H₂O.

Die Auswahl der Puffer geschah nach dem Verhalten der Substrate in Gegenwart der Metalle in den Pufferlösungen. Es wurde versucht, möglichst verschieden verlaufende Oxydationen mit den Chelatbildnern zu beeinflussen.

Ergebnisse (s. Tabelle). –

1. *Ascorbinsäure.* Die *Autoxydation* der Ascorbinsäure wird von EDTA in jedem Puffer gefördert; Propylgallat (PG) dagegen hemmt in m/2 Phosphatpuffer und hat in Imidazol- und Veronalpuffern keinen Einfluss auf die Oxydation. Die Cu⁺⁺-Katalyse der Ascorbinsäure wird im Tris- und Veronalpuffer von EDTA stark gehemmt, dagegen von Propylgallat im Veronalpuffer gesteigert. Die Fe⁺⁺-Katalyse der Ascorbinsäure wird im m/2 Phosphatpuffer und im Trispuffer von EDTA gesteigert, von Propylgallat stark gehemmt.

2. *Adrenalin.* Die *Autoxydation* des Adrenalins wird im m/2 Phosphatpuffer von EDTA stark gehemmt, der Chelatbildner hat im Imidazol- und Collidinpuffer keinen Einfluss auf die Oxydation. Dagegen hat Propylgallat im m/2 Phosphatpuffer keinen Einfluss auf die Katalyse und einen fördernden Effekt im Imidazol- und Collidinpuffer.

Die Cu⁺⁺-Katalyse des Adrenalins wird in den untersuchten Puffern (m/2 Phosphat-, Imidazol- und Collidin-Puffern) von EDTA sowie von Propylgallat zum Teil oder total gehemmt.

⁴⁾ C. FLESC, Dissertation, Bern 1960.

Oxydationsversuche mit und ohne Puffer

Chelatbildner			—			EDTA			Propylgallat				
Substrat	Zeit in Std.		1	2	3	1	2	3	%Hem- mung (—)	1	2	3	%Hem- mung (—)
	Metall	Puffer	μl O ₂ /Zeit			μl O ₂ /Zeit			% Förde- rung (+)	μl O ₂ /Zeit			% Förde- rung (+)
Ascorbinsäure	—	m/2Phosph.	86	160	200	133	234	288	+ 40%	15	20	35	— 82%
	—	Imidazol			10–20	0	20	41	+100%	0	0	6	± 0
	—	Veronal			10–20	3	19	36	+ 80%	0	0	6	± 0
	Cu··	Tris	160	186	192	15	35	52	— 73%	156	175	194	± 0
	Cu··	Veronal	59	150	189	15	28	52	— 73%	169	207	242	+ 28%
	Fe··	m/2Phosph.	208	312	354	422	475	496	+ 45%	13	22	32	— 91%
	Fe··	Tris	40	77	103	177	195	210	+100%	10	18	27	— 74%
Adrenalin	—	m/2Phosph.	0	36	76	0	7	15	— 80%	10	38	70	± 0
	—	Imidazol	0	0	0	0	0	0	± 0%	128	177	197	+++
	—	Collidin	0	0	0	0	0	0	± 0	0	12	20	+++
	Cu··	m/2Phosph.	225	372	450	16	59	117	— 74%	120	256	398	— 12%
	Cu··	Imidazol	364	450	510	0	0	0	—100%	200	330	408	— 20%
	Cu··	Collidin	364	450	498	0	0	0	—100%	118	233	344	— 31%
	Co··	m/2Phosph.	117	270	395	20	73	134	— 66%	267	423	527	+ 32%
	Co··	Veronal	403	485	516	8	35	93	— 82%	428	560	614	+ 20%
	Mn··	m/2Phosph.	144	457	635	20	85	160	— 75%	358	620	787	+ 24%
Mn··	Imidazol	455	500	518	0	0	0	—100%	374	533	588	+ 13%	
Linolsäure	—	Collidin	10	32	55	0	0	0	—100%	50	112	143	+160%
	—	Veronal	0	0	0	0	0	0	± 0	116	166	186	+++
	Cu··	Collidin	50	122	240	0	0	0	—100%	52	112	140	— 42%
	Cu··	Veronal	60	350	635	0	0	0	—100%	86	98	112	— 82%
	Co··	Imidazol	13	56	142	0	0	0	—100%	155	175	186	+ 30%
	Co··	Veronal	550	985	1098	0	0	0	—100%	127	146	156	— 86%

Die *Co*··-Katalyse vom Adrenalin wurde im m/2 Phosphat- und Veronalpuffer untersucht, wobei EDTA eine starke Hemmwirkung, Propylgallat eine steigernde Wirkung des Cobalts verursachte.

Die *Mn*··-Katalyse des Adrenalins wird im m/2 Phosphat- und Imidazolpuffer von EDTA stark gehemmt, dagegen von Propylgallat beschleunigt.

3. *Linolsäure*. Die fast fehlende *Autoxydation* der Linolsäure wird von EDTA nicht beeinflusst, ausser im Collidinpuffer, wo es eine totale Hemmung bewirkt. PG hat eine stark fördernde Wirkung im Collidin- und Veronalpuffer.

Die *Cu*··-Katalyse der Linolsäure wurde im Collidin- und Veronalpuffer untersucht. EDTA hemmt in beiden Puffern total, Propylgallat weist in den beiden Puffern ebenfalls eine starke Hemmwirkung auf.

Die *Co*··-Katalyse der Linolsäure wird im Imidazol- und Veronalpuffer durch EDTA vollkommen gehemmt. Propylgallat hemmt im Veronalpuffer auch, steigert jedoch die katalytische Wirkung des Metalls im Imidazolpuffer. Die zahlenmässige katalytische oder Hemm-Wirkung der Metalle mit und ohne Chelatbildner ist der Tabelle zu entnehmen.

Diskussion. — Wie aus den Versuchen ersichtlich, ist die Wirkung der einzelnen Chelatbildner je nach Substrat und Metall, aber auch je nach Puffer verschieden und kann bei Veränderung der Zusammensetzung des Reaktionsgemisches entgegengesetzt sein.

Die Diskussion der Befunde sollte die sich ergebenden Änderungen der O_2 -Aufnahme durch Zusatz der Chelatbildner, gegenüber Autoxydation und Metallkatalyse

einer allgemein gültigen Interpretation zuzuführen. Dies bietet deswegen erhebliche Schwierigkeiten, weil bereits die Autoxydation in den verschiedenen Puffern eine differente ist, d. h. die Ausgangsbasis ist so für einen allgemeinen Vergleich der Werte nicht identisch und deshalb schwer übersehbar.

Um zu einer einfacheren Übersicht zu kommen, haben wir die Veränderung der O_2 -Aufnahme nach Chelatzusatz in Prozentwerten des gleichen Falles ohne diesen Zusatz ausgedrückt. Diese Werte ergeben zum mindesten einen vergleichbaren Wert der relativen Wirksamkeit der Chelatbildner.

EDTA hemmt die Metallkatalyse von Adrenalin und Linolsäure in allen Puffern und die Autoxydation dieser Substrate in bestimmten Puffern, – es verstärkt die Autoxydation und Fe^{2+} -Katalyse der Ascorbinsäure in allen untersuchten Puffern. Bei der Autoxydation und der Fe^{2+} -katalysierten Oxydation der Ascorbinsäure tritt durch Zusatz von EDTA eine Vermehrung der absoluten Oxydationswerte auf, unabhängig davon, ob der primäre Oxydationswert relativ höher oder niedriger ist. Der Steigerungseffekt ist hier somit offenbar von einem Faktor bedingt, der unabhängig von der absoluten Höhe der primären Katalyse ist.

Während EDTA meist hemmend und nur ausnahmsweise fördernd wirkt, ist der Effekt von Propylgallat je nach Substrat, Metall und Puffermilieu aussergewöhnlich verschiedenartig, z. T. entgegengesetzt.

Propylgallat hemmt die Autoxydation von Ascorbinsäure in (Imidazol- und Veronalpuffer unbedeutend) $m/2$ Phosphatpuffer, und die Fe^{2+} -katalysierte Oxydation im $m/2$ Phosphat- und Trispuffer, steigert dagegen etwas die Cu^{2+} -katalysierte Oxydation im Veronalpuffer, beeinflusst aber die Cu^{2+} -katalysierte Oxydation im Trispuffer nicht. Die Richtung der Wirkung (Hemmung oder Förderung) und ihre Stärke ist unabhängig von der primären Katalyse ohne Propylgallat-Zusatz.

Bei der Adrenalin oxydation hemmt Propylgallat die Cu^{2+} -katalysierte Oxydation in $m/2$ Phosphat-, Imidazol- und Collidinpuffern, lässt die Autoxydation im Phosphatpuffer unbeeinflusst und löst eine Autoxydation bei Imidazol- und Collidinpuffern aus, die ohne Propylgallat fehlt. Gesteigert wird durch Propylgallat die Co^{2+} - und Mn^{2+} -katalysierte Oxydation im $m/2$ Phosphat- und Veronal- bzw. Imidazolpuffer. Auch in diesem Fall ist die Stärke und Richtung der Wirkung von Propylgallat unabhängig von der Oxydation ohne Zusatz, Cu^{2+} scheint systematisch gehemmt, Co^{2+} und Mn^{2+} scheinen gesteigert zu werden.

Bei der Linolsäureoxydation wird die Autoxydation im Collidinpuffer gesteigert, die im Veronalpuffer fehlende ausgelöst, und zwar in einem noch höheren Wert als diejenige im Collidinpuffer. Die durch Cu^{2+} -katalysierte Oxydation wird im Collidinpuffer und im Veronalpuffer gehemmt, wie die durch Co^{2+} -katalysierte im Veronalpuffer; die Co^{2+} -katalysierte im Imidazolpuffer wird leicht gesteigert. Bei dieser Katalyse wird somit die Autoxydation in beiden Puffern verstärkt, die Cu^{2+} -katalysierte Oxydation in zwei Puffern gehemmt, und die Co^{2+} -katalysierte in einem Puffer gehemmt, im anderen gesteigert!

Die vorliegenden Befunde lassen hier die Abhängigkeit der verschiedenen Katalysen vom Puffer in eindeutiger Weise erkennen. Im allgemeinen ist die metallkatalysierte Reaktion in allen Puffern gegenüber der Autoxydation gesteigert. Die Höhe der Steigerung ist bei verschiedenen Metallen von der Art der Puffer weitgehend abhängig.

Die Wirkung von EDTA besteht im allgemeinen in einer Hemmung der Katalyse, mit der Ausnahme der Autoxydation von Ascorbinsäure und der Fe^{++} -katalysierten Oxydation derselben, die gefördert werden. Die Stärke der Hemmung und die Stärke der Förderung ist bei Ascorbinsäure und Adrenalin unterschiedlich und scheint nicht abhängig von der Grösse der Katalyse ohne EDTA, sondern ist von der Art des Metalls, des Puffers und des Substrates abhängig. Nur die Linolsäureoxydation wird in allen Fällen gehemmt.

Bei Propylgallat ergibt sich ein wesentlich komplizierteres Bild. Es kommen vor: Hemmung, fehlender Einfluss, Auslösung einer ohne Propylgallat nicht vorhandenen Katalyse und Förderung einer vorhandenen Katalyse. Eine systematische Anordnung der Wirkungsarten von Propylgallat in den experimentellen Bedingungen ist nicht möglich, es kann nur soviel geschlossen werden, dass die Wirkungsrichtung von Propylgallat bei Autoxydation von der Pufferqualität, bei Metallkatalyse auch vom Metall, nicht aber von der Höhe der primären Katalyse ohne Propylgallat-Zusatz abhängig erscheint. Bei einzelnen Fällen scheint ein absoluter Faktor, bei anderen Fällen ein prozentualer Faktor die Katalyse zu bestimmen, mit oder ohne Zugabe von Chelatbildnern.

Die Befunde bestätigen und erweitern somit diejenigen von TANNER dahin, dass die verschiedenartigen Milieuänderungen den Einfluss von Chelatbildnern als Hemmung oder Förderung auftreten lassen. Es ist besonders bei gewissen Chelatbildnern, wie Propylgallat, eine prooxydative Wirkung in einem relativ grossen Prozentsatz von Reaktionsituationen festzustellen – in den vorliegenden wirkt Propylgallat in ca. 50% der Fälle fördernd. Es ist wahrscheinlich, dass derartige Situationen auch für den praktischen Gebrauch der Chelatbildner, sei es als Antioxydantien, sei es für andere Zwecke, von wesentlicher Wichtigkeit sein müssen.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Autoxydation und metallkatalytische Oxydation von drei Substraten (Ascorbinsäure, Adrenalin und Linolsäure) wurden in fünf verschiedenen Pufferlösungen mit und ohne Zusatz von Chelatbildnern ($\text{EDTA} = \text{Äthylendiamin-tetraacetat}$ und Propylgallat) manometrisch nach WARBURG bestimmt.

EDTA hemmt die Oxydation der Substrate in den meisten Fällen, mit Ausnahme der Autoxydation und der Fe^{++} -katalysierten Ascorbinsäureoxydation, welche durch EDTA gefördert werden. Propylgallat hemmt die Oxydation in 9 Versuchsvarianten, hat aber überraschenderweise in 10 Varianten eine oxydationsfördernde Wirkung. In 4 Varianten hat Propylgallat keinen Einfluss auf die Oxydation. Die fördernde oder hemmende Wirkung der Chelatbildner ist unabhängig von der absoluten Stärke der Oxydationsreaktion ohne ihren Zusatz und ist offenbar bei den beiden geprüften von mannigfachen Faktoren abhängig.

Da Propylgallat in die Gruppe der phenolischen Antioxydantien gehört und als solches häufig für Fette und fetthaltige Nahrungsmittel verwendet wird, wird die Aufmerksamkeit auf die prooxydative Wirkung dieses Stoffes gerichtet, sowie auf den Einfluss des Milieus, in welchem es verwendet wird.

Forschungslaboratorien der CIBA Aktiengesellschaft, Basel
Pharmazeutische Abteilung