

# Untersuchungen über den Abbau der L-Ascorbinsäure durch ionisierende Strahlung in wäßriger Lösung, 3. Mitt.

Von

**M. Z. Barakat, M. F. Abdel-Wahab und Y. M. Megahed**

Aus dem Biochemistry Department, Faculty of Veterinary Medicine, Cairo University, und dem M. E. R. Radioisotope Centre, Dokki, Cairo, V. A. R.

Mit 6 Abbildungen

(Eingegangen am 10. Juli 1964)

Es wird die Wirkung der Bestrahlung von wäßrigen Lösungen der L-Ascorbinsäure durch  $\gamma$ -Strahlen verschiedener Intensitäten zwischen 10 000 und 100 000  $r$  aufgezeigt. Als Strahlenquelle dient  $^{137}\text{CsCl}$ . Der Oxidationsmechanismus und der des Abbaus von L-Ascorbinsäure in wäßriger Lösung durch ionisierende Strahlen wird beschrieben.

The effect of  $\gamma$ -irradiation emitted from radioactive caesium at various levels ranging from 10 000 to 100 000  $r$  of  $^{137}\text{CsCl}$  on an aqueous solution of L-ascorbic acid is shown. The mechanism of oxidation and breakdown of L-ascorbic acid in aqueous solution by ionising radiation is reported.

Schon vor einiger Zeit ist die Wirkung hochgespannter Kathodenstrahlen auf L-Ascorbinsäure (I) beschrieben worden<sup>1</sup>. In neuerer Zeit konnte gezeigt werden, daß der Abbau der Dehydro-L-Ascorbinsäure (II) zu 2,3-Diketo-L-gulonsäure (III) in saurem Medium nach der ersten Ordnung abläuft, in schwach alkalischer Pufferlösung wird diese Säure jedoch sehr rasch zu Oxalsäure (IV) zersetzt<sup>2</sup>. Ferner konnte die Zersetzung der L-Ascorbinsäure zu Dehydro-L-ascorbinsäure und Diketo-L-gulonsäure durch Bakterien nachgewiesen werden<sup>3</sup>.

<sup>1</sup> B. E. Proctor und J. P. O'Meara, Ind. Engng. Chem. **43**, 718 (1951).

<sup>2</sup> C. Nofre, A. Cier, B. Drevon und A. Lefier, Bull. Soc. Chim. France **1960**, 245.

<sup>3</sup> S. Kamiya, J. Vitaminol. **6**, 217 (1960); Chem. Abstr. **55**, 16660 (1961).

Die Feststellung, daß die Lagerfähigkeit von Lebensmitteln am wirkungsvollsten durch Bestrahlung mit  $\gamma$ -Strahlen<sup>4</sup> erhöht wird, hat uns veranlaßt, unsere früheren Studien<sup>5</sup> fortzuführen und die Wirkung der  $\gamma$ -Strahlen auf wäßrige Lösungen des reinen Vitamins eingehend zu untersuchen.

### Experimenteller Teil

Eine 0,1proz. Lösung reiner L-Ascorbinsäure (Carlo Erba, Mailand) in destill. Wasser wurde hergestellt und ihr genauer Gehalt an reinem Vitamin durch die N-Bromsuccinimid-Methode<sup>6</sup> bestimmt. In gleicher Weise wurden weitere Lösungen des reinen Vitamins bereitet und vor der Bestrahlung auf ihren Gehalt geprüft.

Die wäßrigen Lösungen des Vitamins wurden radioaktivem Caesium ausgesetzt, und zwar diente als Quelle der äußeren  $\gamma$ -Strahlen  $^{137}\text{CsCl}$  (Raumbedingungen [„in door facility“]) von verschiedenen Intensitäten zwischen 10000 bis 100000  $r$ .

Dehydro-L-ascorbinsäure (DHA) wurde nach der Bestrahlung in Form ihres Osazons<sup>7</sup> durch Behandeln mit Phenylhydrazinhydrochlorid bestimmt.

$$\text{DHA-Faktor} = \frac{\text{DHA}}{\text{Osazon}} = \frac{174}{354} = 0,49.$$

Die 2,3-Diketo-L-gulonsäure wurde durch Fällung mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin bestimmt<sup>8</sup>. Zur Herstellung einer Vergleichskurve wurde außerdem 2,3-Diketo-L-gulonsäure nach der Methode von Penney und Zilva<sup>9</sup> dargestellt. L-Threonsäure (V) wurde als Brucinsalz gefällt<sup>10</sup> und so deren Menge ermittelt:

$$\text{L-Threonsäure-Faktor} = \frac{136}{601,52} = 0,23$$

Der Gehalt an Oxalsäure wurde durch Titration mit 0,01n-KMnO<sub>4</sub> festgestellt<sup>11</sup>.

Die Bildung von CO<sub>2</sub> stellten wir durch Einwirkung von Na<sup>131</sup>I auf eine L-Ascorbinsäurelösung in einem geschlossenen System fest. Das entwickelte Gas wurde in Barytwasser aufgefangen, das sich eine Stunde nach Beginn des Versuches trübte.

<sup>4</sup> L. E. Brownell, F. G. Gustafson, J. V. Nehemias, D. R. Isleib und W. J. Hooker, Food Technol. **11** (6), 306 (1957).

<sup>5</sup> M. Z. Barakat, M. F. Abdel-Wahab und Y. M. Megahed, Mh. Chem. **95**, 1613 (1964).

<sup>6</sup> M. Z. Barakat, M. F. Abdel-Wahab und M. M. El-Sadr, Anal. Chem. **27**, 536 (1955).

<sup>7</sup> R. W. Herbert, E. L. Hirst, E. G. V. Percival, R. J. W. Reynolds und F. Smith, J. Chem. Soc. [London] **1933**, 1270. J. C. Ghosh und P. C. Rakshit, Biochem. Z. **299**, 394 (1938).

<sup>8</sup> J. H. Roe und C. A. Kuether, J. Biol. Chem. **147**, 399 (1943).

<sup>9</sup> J. R. Penney und S. S. Zilva, Biochem. J. **39**, 1 (1945).

<sup>10</sup> H. J. Lucas und W. Baumgarten, J. Amer. Chem. Soc. **63**, 1653 (1941).

<sup>11</sup> R. M. Flower und H. A. Bright, J. Res. Nation. Bur. Stand. **15**, 493 (1935).

Einen Blindversuch mit unbestrahlten Lösungen des reinen Vitamins führten wir gleichzeitig durch, um gegebenenfalls eines der oben erwähnten Abbauprodukte aufzufinden und zu bestimmen.

### Ergebnisse

Dehydro-L-ascorbinsäure konnte als Osazon<sup>7</sup> isoliert werden und so durch dessen Schmelzpunkt 218°C und den Mischschmelzpunkt mit einem authentischen Produkt identifiziert werden.

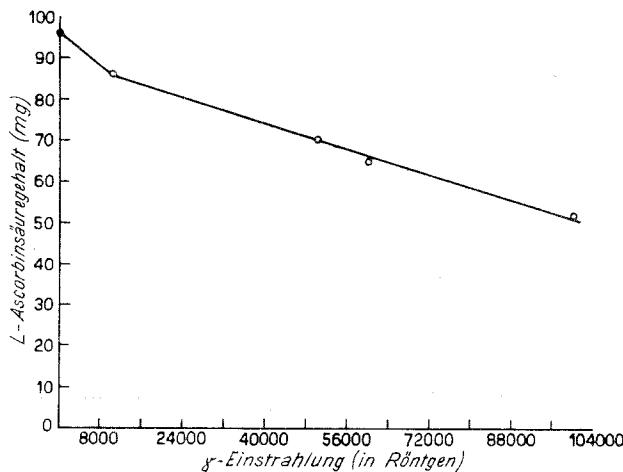


Abb. 1. Einfluß der  $\gamma$ -Strahlung auf den L-Ascorbinsäuregehalt

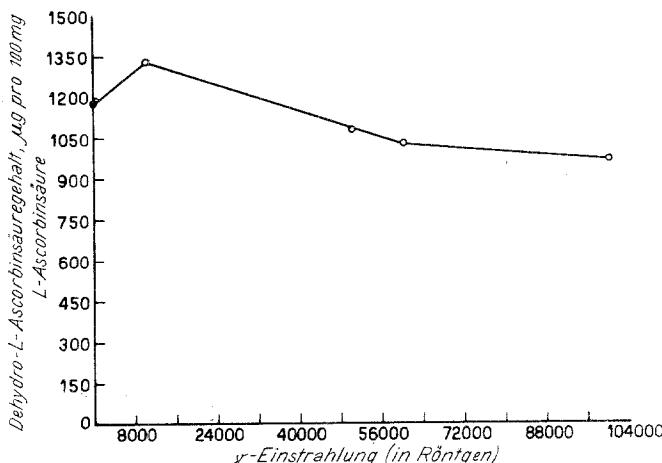


Abb. 2. Eichkurve: Einfluß der  $\gamma$ -Strahlung auf den Dehydro-L-Ascorbinsäuregehalt

2,3-Diketo-L-gulonsäure-osazon konnte als rotes Pulver abgeschieden werden. Es schmolz bei 202—203°C unter Zersetzung. Es scheint

die Lactonform<sup>12</sup> des Diketogulonsäureosazons vorzuliegen, da es sowohl in Wasser als auch in verd. NaOH unlöslich war und mit Natrium-

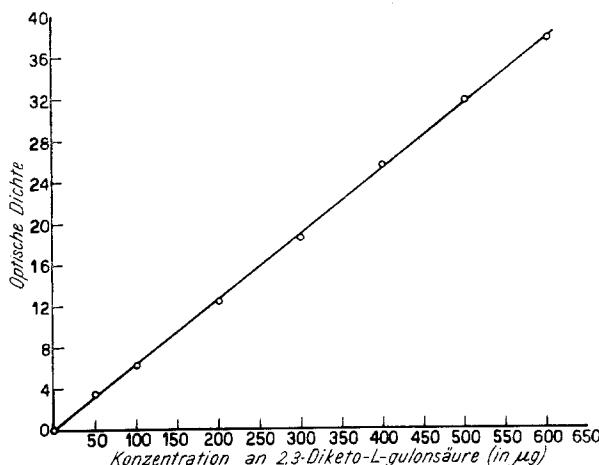


Abb. 3. Abhängigkeit der Konzentration an 2,3-Diketo-L-gulonsäure von der optischen Dichte bei 540 mp. (im EEL-Colorimeter)

carbonat nicht aufschäumte. Es löste sich dagegen leicht in Alkohol und Aceton, jedoch schwer in Äther, Benzol oder Chloroform.

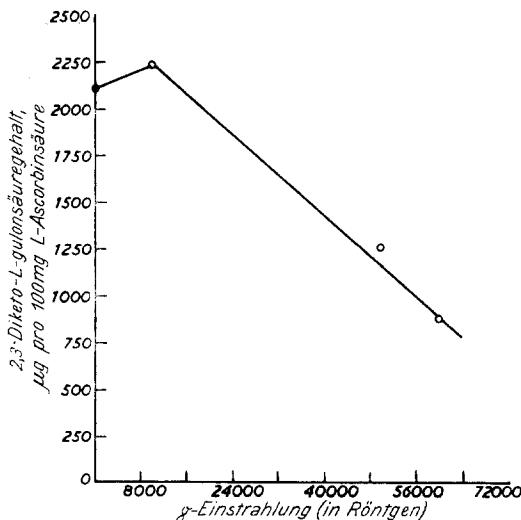


Abb. 4. Eichkurve: Einfluß der  $\gamma$ -Strahlung auf den Gehalt an 2,3-Diketo-L-gulonsäure

L-Threonsäure wurde als Brucinsalz abgetrennt<sup>10</sup>. Dieses schmolz bei 203—204°C unter Zersetzung.

<sup>12</sup> H. Ohle, Ber. deutsch. Chem. Ges. **67**, 1750 (1934).

Die nach der Bestrahlung erhaltenen Ergebnisse werteten wir für jedes Abbauprodukt getrennt aus, wie es aus Abb. 1, 2, 3a, 3b, 4 und 5,

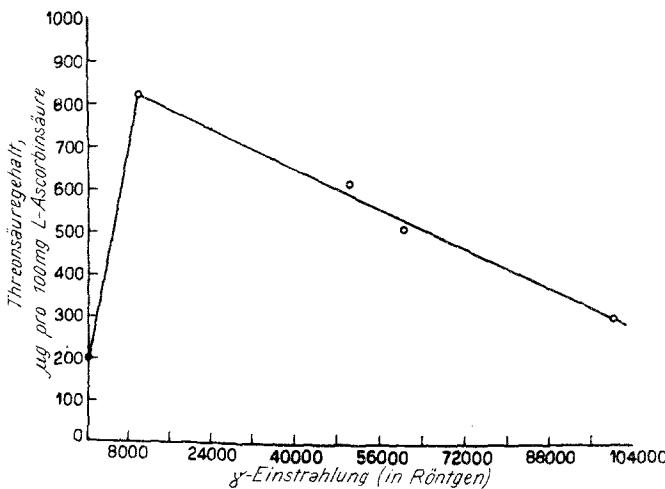


Abb. 5. Einfluß der  $\gamma$ -Strahlung auf den Gehalt an Threonsäure

welche der Reihe nach L-Ascorbinsäure, Dehydro-L-ascorbinsäure, 2,3-Diketo-L-gulonsäure, L-Threonsäure und Oxalsäure entsprechen, ersicht-

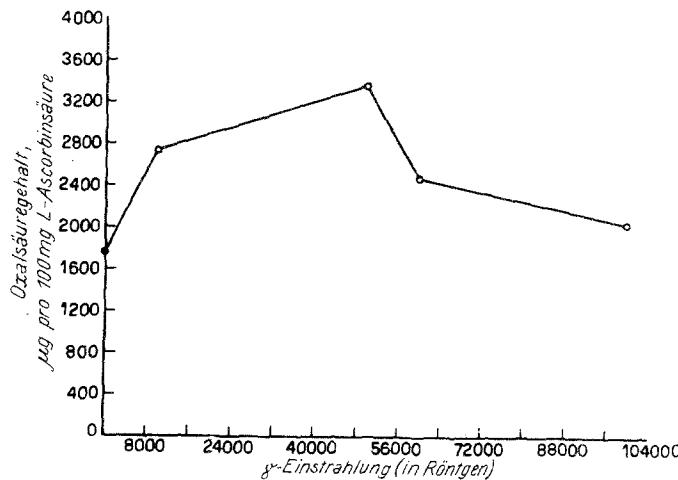


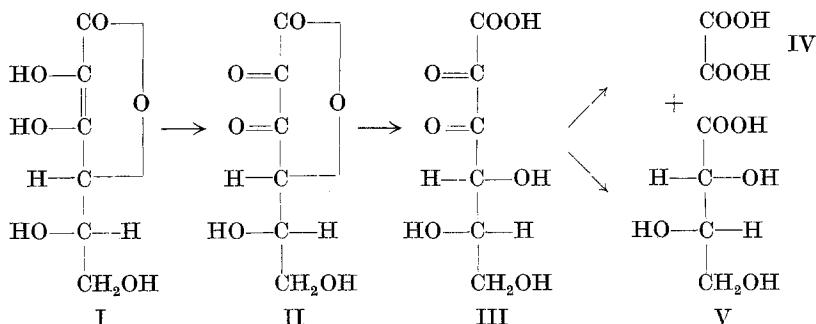
Abb. 6. Einfluß der  $\gamma$ -Strahlung auf den Oxalsäuregehalt

lich ist. Dabei ist der Gehalt an L-Ascorbinsäure in mg pro 100 ml der wässrigen Lösung, der Gehalt der nach der Bestrahlung erhaltenen Abbauprodukte in  $\mu\text{g}$  pro 100 mg L-Ascorbinsäure angegeben.

### Diskussion

Aus den Versuchen geht eindeutig hervor, daß alle angewendeten  $\gamma$ -Strahlenintensitäten eine Verminderung an L-Ascorbinsäure verursachen. Die Änderung des Gehalts an L-Ascorbinsäure in wäßrigen Lösungen des reinen Vitamins durch Bestrahlung ist eine Folge der Oxydation der L-Ascorbinsäure zu Dehydro-L-ascorbinsäure. Die Geschwindigkeit der Oxydation steigt mit der Stärke der  $\gamma$ -Bestrahlung (vgl. Abb. 1 und 2). Dieses Ergebnis steht in voller Übereinstimmung mit früheren Befunden<sup>13, 14</sup> über die Wirkung von Bestrahlung mit  $^{60}\text{Co}$  und  $\gamma$ -Strahlen auf L-Ascorbinsäure. Da nun sowohl L-Ascorbinsäure als auch Dehydro-L-ascorbinsäure biologisch aktiv sind, ist es klar, daß man ein getreues Bild der Wirkung dieser Behandlung nur durch die Bestimmung des Gesamtvitamins, d. h. der L-Ascorbinsäure und der Dehydro-L-ascorbinsäure, erhalten kann. Bezogen auf das Gesamtvitamin ist dann die Verminderung etwas geringer als wenn man nur die reduzierte Form berücksichtigt.

Die Ascorbinsäure (reduz. Form) wird durch die Bestrahlung in beträchtlichem Ausmaße zerstört: Diese Verminderung ist um so größer, je höher die angewendete Intensität ist (Abb. 1—5). Die Ergebnisse deuten darauf hin, daß der Abbau der L-Ascorbinsäure durch Bestrahlung nach dem üblichen Schema wie folgt verläuft:



Der unmittelbar nach der Bestrahlung durch geringe Intensitäten einsetzende Konzentrationsanstieg der jeweiligen Abbauprodukte in der wäßrigen Lösung des reinen Vitamins ist eine Folge der Erhöhung ihrer Bildungsgeschwindigkeit. (Abb. 2—5). Andrerseits ist der langsame Konzentrationsabfall der einzelnen Abbauprodukte bei höheren Intensitäten ein Zeichen dafür, daß sie dann weiterer Zersetzung unterliegen, die

<sup>13</sup> E. G. Sal'kova, Doklady Akad. Nauk S. S. S. R. **114**, 757 (1957); Chem. Abstr. **52**, 11310 (1958).

<sup>14</sup> B. S. Narasinga Rao, Radiat. Research **17**, 683 (1962).

schließlich zur Bildung von Kohlendioxid führt. Außerdem scheint es uns von Interesse zu bemerken, daß wir aus der bestrahlten Lösung die 2,3-Diketo-L-gulonsäure als Lacton des Diketogulonsäureosazons isoliert haben. Diese Beobachtung steht im Gegensatz zu einem früheren Bericht<sup>1</sup> über die Wirkung von Hochspannungs-Kathodenstrahlen auf L-Ascorbinsäure, stimmt aber überein mit Untersuchungen über den Abbau von Dehydroascorbinsäure<sup>2</sup> in wäßriger Lösung und über die Zersetzung von L-Ascorbinsäure durch Bakterien<sup>3</sup>.