

In der letzten Stufe wurden durch Trifluoressigsäure alle Schutzgruppen abgespalten. Nach Fällen mit Äther lag die Verbindung als Trifluoressigsäure vor. Die Aminosäureanalyse lautet (erwartete Werte in Klammer):

Asp 1,01 (1); Glu 7,12 (7); Gly 7,13 (7);
Ala 5,02 (5); Val 1,00 (1); Leu 5,31 (5);
Pro 2,84 (3); Lys 1,06 (1); NH₃ 4,70 (5);
Arg 2,42 (3).

Das korrekte Asp/Val-Verhältnis zeigt das Gelingen der Verknüpfung von [1–9] mit [10–33] an, da Asp nur im ersteren, Val nur im letzteren Teilstück vorkommt. Erniedrigte Werte für Arg, wie sie hier gefunden wurden, beobachteten wir auch bei der Aminosäureanalyse wohldefinierter Zwischenprodukte.

Im Papierelektropherogramm war die Laufstrecke des Triacontatripeptids bei 400 V und 3 Stdn. Laufzeit in 20-proz. Ameisensäure 8,1 cm. Hierbei trat in geringerer Menge ein Nebenprodukt mit einer Laufstrecke von 7,6 cm in Erscheinung.

Optimierung der oxydativen Spaltung mit $\text{MnO}_4^\ominus/\text{JO}_4^\ominus$

II. Mitteilung: Dien- und Trienfettsäuren

GERNOT GRIMMER und JÜRGEN JACOB

Universität Hamburg

(Z. Naturforschg. **24 b**, 1004–1008 [1969]; eingegangen am 14. April 1969)

Es wird eine Optimierung der oxydativen Spaltung von Doppelbindungen mit $\text{MnO}_4^\ominus/\text{JO}_4^\ominus$ bei Dien- und Trienfettsäuren beschrieben. Erwartungsgemäß zeigte sich, daß die Ausbeute der Hauptreaktion wesentlich von der Reaktionsdauer und der Permanganatmenge abhängt. Unter optimalen Bedingungen findet man 1,5–1,7% Überoxydations-Produkte.

Auch die bei der Spaltung entstehende Malonsäure wird zu ca. 90% erfaßt.

Bei der oxydativen ozonolytischen Spaltung von Linol- und Linolensäuremethylester entstehen im Gegensatz zur $\text{MnO}_4^\ominus/\text{JO}_4^\ominus$ -Spaltung neben den Hauptkomponenten weitere nicht identifizierte Produkte.

Die Vorteile der oxydativen Spaltung mit $\text{MnO}_4^\ominus/\text{JO}_4^\ominus$ liegen in einer einfachen Durchführung, der exakten Dosierbarkeit des Oxydationsmittels und der geringen Überoxydation.

Wir haben kürzlich über die Optimierung der oxydativen Spaltung von Monoenfettsäuren mit $\text{MnO}_4^\ominus/\text{JO}_4^\ominus$ berichtet¹. Es soll jetzt die Optimierung dieser Methode für Dien- und Trienfettsäuren im Mikromaßstab beschrieben werden.

In den letzten Jahren sind zahlreiche Arbeiten über die Strukturaufklärung nativer ungesättigter Fettsäuren und deren Derivate z. B. Triglyceride mit Hilfe der ozonolytischen^{2–19}, der oxydativen Spaltung mit $\text{MnO}_4^\ominus/\text{JO}_4^\ominus$ ^{20–25} oder der Massen-

¹ G. GRIMMER u. J. JACOB, Z. Naturforschg. **24 b**, 565 [1969].

² E. KLENK u. G. TSCHÖPE, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **334**, 193 [1963].

³ R. G. ACKMAN, M. E. RETSON, L. R. GALLAY u. F. A. VANDEN HEUVEL, Canad. J. Chem. **39**, 1956 [1961].

⁴ Y. KISHIMOTO u. N. S. RADIN, J. Lipid Res. **4**, 437 [1963].

⁵ Y. KISHIMOTO u. N. S. RADIN, J. Lipid Res. **5**, 98 [1964].

⁶ K. F. GUENTHER, G. SOSNOVSKY u. R. BRUNIER, Analytic. Chem. **36**, 2508 [1964].

⁷ O. S. PRIVETT u. E. C. NICKELL, J. Amer. Oil Chemists' Soc. **43**, 393 [1966].

⁸ M. BEROZA u. B. A. BIERL, Analytic. Chem. **39**, 1131 [1967].

⁹ W. STOFFEL u. E. H. AHRENS, JR., J. Amer. chem. Soc. **80**, 6604 [1958].

¹⁰ R. A. STEIN u. N. NICOLAIDES, J. Lipid Res. **3**, 476 [1962].

¹¹ S. RAMACHANDRAN, P. V. RAO u. D. G. CORNWELL, J. Lipid Res. **9**, 137 [1968].

¹² O. S. PRIVETT u. E. C. NICKELL, J. Amer. Oil Chemists' Soc. **39**, 414 [1962].

¹³ O. S. PRIVETT, M. L. BLANK u. O. ROMANUS, J. Lipid Res. **4**, 260 [1963].

¹⁴ D. SAND, N. SEN u. H. SCHLENK, J. Amer. Oil Chemists' Soc. **42**, 511 [1965].

¹⁵ V. L. DAVISON u. H. J. DUTTON, Analytic. Chem. **38**, 1302 [1966].

¹⁶ O. LORENZ, Analytic. Chem. **37**, 101 [1965].

¹⁷ P. RONKAINEN u. S. BRUMMER, J. Chromatogr. **28**, 253 [1967].

¹⁸ E. KLENK u. W. BONGARD, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **290**, 181 [1952].

¹⁹ F. L. BENTON, A. A. KIESS u. H. J. HARWOOD, J. Amer. Oil Chemists' Soc. **36**, 457 [1959].

spektrometrie²⁶⁻²⁸ erschienen. Die beiden oxydativen Spaltungsmethoden sind wiederholt verbessert und kritisch untersucht worden.

Die anfangs in Chloroform, Methanol oder Methylenchlorid ausgeführte Ozonolyse³⁻⁶ führte nur zu mäßigen Ausbeuten; diese konnten durch Verwendung von Pentan⁷ bzw. Schwefelkohlenstoff⁸ verbessert werden.

Die hydrierende Spaltung⁷⁻¹¹ der Ozonide liefert angeblich zwar keine^{12, 13} oder nur wenig⁸ Nebenprodukte; jedoch ist die gaschromatographische Auswertung der freien Aldehyde schwierig^{11, 14}, da diese einerseits relativ schnell weiterreagieren¹⁴ und sich andererseits die niedrigen Vertreter nicht unzersetzt gaschromatographieren lassen¹⁵. Diese Schwierigkeiten lassen sich teilweise entweder durch direkte Hydrierung der Ozonide im Einspritzblock des Gaschromatographen⁷ oder durch gaschromatographische Trennung der 2.4-Dinitrophenylhydrazonzone¹⁷ umgehen.

Die oxydative Spaltung der Ozonide^{4, 18, 19} liefert dagegen zahlreiche Nebenprodukte und erhebliche Überoxydation. Nach pyrolytischer Spaltung im Einspritzblock des Gaschromatographen ist auch eine direkte gaschromatographische Analyse der Ozonide möglich¹⁵; sie liefert jedoch wegen ihres vergleichsweise unübersichtlichen Verlaufes zahlreiche Spaltstücke, was eine quantitative Auswertung unmöglich macht.

Die quantitative Erfassung des Malondialdehyds ist bislang ungelöst.

Bei der oxydativen Spaltung mit $\text{MnO}_4^\ominus/\text{JO}_4^\ominus$ ist wiederholt auf den quantitativen Verlauf und die nur geringe Überoxydation dieser Reaktion hingewiesen worden^{21, 23}. Durch Extraktion der Spaltstücke mit Tetramethylammoniumhydroxid²⁵ ist die Methode kürzlich verbessert worden.

Nahezu alle erschienenen Arbeiten lassen aber entweder eine quantitative Bestimmung der wiedergefundenen Bruchstücke bezogen auf das Ausgangs-

material oder eine kritische Auseinandersetzung mit der Überoxydation vermissen.

Dagegen finden sich nach der Spaltung nativer Fettsäuregemische einer Kettenlänge unter den Dicarbonsäuren regelmäßig neben der Hauptkomponente wechselnde Mengen kürzerkettiger Dicarbonsäuren, die entweder das Vorhandensein von Doppelbindungsisomeren anzeigen oder es vortäuschen. Die Frage, ob es sich hierbei um Artefakte handelt, läßt sich nur bei Verwendung isomerenfreier Dien- und Trienfettsäuren als Testsubstanzen für die Spaltung entscheiden.

Da einerseits gaschromatographisch einheitliche 9c.12c-Octadecadien- und 9c.12c.15c-Octadecatriensäure aus nativem Material leicht zugänglich ist²⁹ und wir andererseits 8c.11c-Octadecadiensäure synthetisch dargestellt haben³⁰, lag es nahe, die Spaltungsmethode nochmals systematisch zu untersuchen und sie für die Dien- und Triensäuren zu optimieren.

Material und Methode

Material

Die Herkunft der zur Spaltung eingesetzten 8c.11c- und 9c.12c-Octadecadien- resp. 9c.12c.15c-Octadecatriensäure haben wir bereits beschrieben^{29, 30}. Die Einheitlichkeit des Ausgangsmaterials wurde gaschromatographisch an verschiedenen Kapillarsäulen, die sowohl *cis/trans*- als auch positionisomere Fettsäuremethylester auftrennen, überprüft.

Die Reinheit der 9c.12c-Octadecadien- bzw. 9c.12c.15c-Octadecatriensäure betrug 99,8 Prozent. Die synthetisch dargestellte 8c.11c-Octadecadien- bzw. 8.11-Octadecadiensäure war 98,9-prozentig.

Gaschromatographie

Gerät: Perkin-Elmer, Überlingen, Typ F7/4H mit FI-Detektor und elektronischem Integrator D 2.

²⁰ E. VON RUDLOFF, J. Amer. Oil Chemists' Soc. **33**, 126 [1956].

²¹ A. P. TULLOCH u. B. M. CRAIG, J. Amer. Oil Chemists' Soc. **41**, 322 [1964].

²² J. TINOCO u. P. G. MILJARNICK, Analytic. Biochem. **11**, 548 [1965].

²³ E. P. JONES u. V. L. DAVISON, J. Amer. Oil Chemists' Soc. **42**, 121 [1965].

²⁴ R. J. VANDER WAL, J. Amer. Oil Chemists' Soc. **42**, 754 [1965].

²⁵ D. T. DOWNING u. R. S. GREENE, Lipids **3**, 96 [1968].

²⁶ G. W. KENNER u. E. STENHAGEN, Acta chem. scand. **18**, 1551 [1964].

²⁷ K. K. SUN, H. W. HAYES u. R. T. HOLMAN, IX. ISF-Kongreß, 1968.

²⁸ W. G. NIEHAUS, JR. u. R. RYHAGE, Tetrahedron Letters [London] **1967**, 5021.

²⁹ J. JACOB u. G. GRIMMER, Z. Naturforsch. **23 b**, 1385 [1968].

³⁰ J. JACOB u. G. GRIMMER, Tetrahedron Letters [London], **21**, 1693 [1969].

Zur Analyse der Polyenfettsäuremethylester wurden folgende Säulentypen verwendet:

1. 50-m-Kapillarsäure, ϕ 0,25 mm, Perkin-Elmer 1G54, stationäre Phase: Diäthylenglykoladipat-polyester bei 170°; 1 ml N₂/Minute. 27 000 theoret. Bodenäquivalente (HETP) für Ölsäuremethylester.

2. 50-m-Kapillarsäure, ϕ 0,25 mm, Perkin-Elmer 1G1, stationäre Phase: Apiezon bei 190°; 1 ml N₂/Minute. 106 000 HETP für Ölsäuremethylester.

3. 25-m-Kapillarsäule, ϕ 0,25 mm, Perkin-Elmer 2G51, stationäre Phase: Butandiolsuccinatpolyester bei 170°; 1 ml N₂/Minute. 35 000 HETP für Azelainsäuredimethylester.

Die Dicarbonsäuremethylester wurden an Säule (3) sowie zusätzlich an einer

4. 2-m-Stahlsäule, ϕ 3 mm, stationäre Phase: Diäthylenglykolsuccinat 20% auf Celite bei 190°; 35 ml N₂/Min. (3600 HETP für Azelainsäuredimethylester) untersucht.

Beide Säulen (3 und 4) erlauben die Auswertung des Malonsäuredimethylesters bei 160°.

Die Monocarbonsäuren lassen sich als freie Säuren auf

5. 2-m.-Stahlsäulen, ϕ 4,65 mm, mit Porapak Q bei 210 – 250° und 37 ml N₂/min (1260 HETP für Capronsäure) oder als Methylester an den Säulen 1, 3 und 4 trennen.

Die 2.4-Dinitrophenylhydrazone wurden an einer 6. 2-m.-Stahlsäule, ϕ 4,65 mm, stationäre Phase: SE 52, 5% auf Celite 545 bei 255° und 35 ml N₂/Min. (1200 HETP für Pentanal-2.4-dinitrophenylhydrazon) untersucht.

Beschreibung eines Spaltansatzes mit MnO₄[⊖]/JO₄[⊖]

Linolensäuremethylester (2,60 mg = 0,0089 mMol) wurden in 90-proz. wäbr. tert. Butanol (2,5 ml) gelöst und 2-proz. wäbr. NaJO₄-Lösung (2,77 ml = 0,213 mMol = 24 Mole/Mol Ester), 1-proz. wäbr. K₂CO₃-Lösung (1,1 ml = 0,08 mMol = 9 Mole/Mol Ester) sowie eine 0,1-proz. wäbr. KMnO₄-Lösung (0,8 ml = 0,005 mMol = 0,57 Mol/Mol Ester) zugegeben und bei 20° 4 Stdn. stehengelassen.

Danach wurde der Ansatz portionsweise mit festem Na₂SO₃ entfärbt und mit wäbr. 2-n. KOH alkalisch gemacht. Nach Abdampfen des Butanols bei 45° im Vakuum (20 Torr) zur Trockne wurde

mit 2-n. Schwefelsäure angesäuert und durch zweimalige Extraktion mit der 10-fachen Menge Äther alle Säuren ausgeschüttelt. Aus der Ätherphase wurden die Säuren mit etwas mehr als der berechneten Menge $n/10$ -NaOH (0,5 – 1 ml) extrahiert und nach Abdampfen des Lösungsmittels mit 5-proz. methanolischer HCl in die Methylester überführt.

Ozonolyse von Linolensäuremethylester

Linolensäuremethylester (29,2 mg = 0,1 mMol) wurde in Essigester (15 ml) und Eisessig (10 ml) gelöst, mit einer Spur Sudanrot versetzt und bei 0° bis zur beginnenden Entfärbung des Indikators Ozon eingeleitet. Der Ansatz wurde halbiert und der eine Teil zur oxydativen Spaltung, mit Eisessig (5 ml) und 30-proz. H₂O₂ (1 ml) versetzt, 3 Tage bei 37° stehengelassen. Nach Zugabe einer Spur PtO₂ wurde kurz zum Sieden erhitzt und die Monocarbonsäuren sowie die Dicarbonsäurehalbesten in der üblichen Weise extrahiert und gaschromatographisch untersucht.

Der andere Teil des Spaltansatzes wurde mit PtO₂/H₂ hydriert (reduktive Spaltung) und die entsprechenden Aldehyde mit 2.4-Dinitrophenylhydrazin in die 2.4-Dinitrophenylhydrazone überführt. Diese wurden an der Säule (6) gaschromatographisch untersucht.

Ergebnisse

Spaltungen unter verschiedenen Bedingungen

In den Tabn. 1 und 2 sind die Resultate einiger Spaltungen unter verschiedenen Bedingungen wiedergegeben, während Tab. 3 alle Bruchstücke zweier optimierter Spaltungen (in Molen ausgedrückt) wiedergibt.

Die Tab. 4 gibt die Ergebnisse der ozonolytischen Spaltung von Linol- und Linolensäuremethylester mit anschließender oxydativer Spaltung der Ozonide wieder.

Die am Beispiel des Linolensäuremethylesters durchgeführte hydrierende Spaltung der Ozonide mit nachfolgender Gaschromatographie der 2.4-Dinitrophenylhydrazone ergab 0,83 Mol Äthanal-2.4-dinitrophenylhydrazon pro Mol Hexanal-2.4-dinitrophenylhydrazon, was einer relativen Ausbeute von 83% entspricht. Der gleichzeitig entstehende 9-Oxonansäure-methylester wurde dabei nicht erfaßt.

Substanz	Reakt.-Zeit [Stdn.]	MnO_4^- -Menge [Mol/Mol Ester]	Spaltprodukte [Mol-%]			Ausgangsmaterial [Mol-%]
			D ₇	D ₈	D ₉	
9c.12c-Octadecadiensäuremethylester	1	0,11	—	0,3	37,7	62,0
	2	0,11	—	0,4	55,9	43,7
	3	0,11	—	0,4	85,9	13,7
	4	0,11	0,2	1,6	98,2	—
	5	0,11	1,1	2,9	96,0	—
	4	0,05	—	0,3	88,7	11,0
	4	0,50	1,0	2,4	96,6	—
	8.11-Octadecadiensäuremethylester	4	0,10	0,9	98,9	(0,2% D ₆)
8c.11c-Octadecadiensäuremethylester	4	0,10	0,5	97,0	2,5	—

Tab. 1. Oxydative Spaltungen von Dien- bzw. Diincarbonsäuremethylestern mit MnO_4^-/JO_4^- . Konstant gehaltene Bedingungen: 6 Mole K_2CO_3 und 16 Mole $NaJO_4$ pro Mol Ester, 20°. D₇ = Heptan-1.7-disäure (Pimelinsäure); D₈ = Octan-1.8-disäure (Korksäure); D₉ = Nonan-1.9-disäure (Azelainsäure).

Bedingungen	Reakt.-Zeit [Stdn.]	MnO_4^- -Menge [Mol/Mol Ester]	Spaltprodukte			Ausgangsmaterial
			D ₇	D ₈	D ₉	
24 Mole $NaJO_4$ /Mol Ester	4	0,89	0,4	2,7	96,9	—
9 Mole K_2CO_3 , 15 Mole $NaJO_4$ /Mol Ester	5	0,20	2,6	2,7	92,8	2,5
9 Mole K_2CO_3 , 24 Mole $NaJO_4$ /Mol Ester	1	0,00063	0,9	1,1	15,5	82,5
	1	0,051	0,7	1,2	43,6	54,5
	1	0,500	0,9	0,8	78,0	20,3
	2	0,00088	0,9	1,9	19,2	78,0
	2	0,038	0,8	1,6	82,0	15,6
	2	0,500	1,4	0,8	91,6	6,2
	4	0,160	1,5	1,4	95,3	1,8
	4	0,460	1,6	1,7	95,7	1,0
	4	0,490	1,4	1,7	96,2	0,7
	4	0,540	1,2	1,7	97,1	—
	4	0,710	2,0	5,2	92,8	—
	4	0,820	1,7	6,5	91,8	—

Tab. 2. Spaltungen von 9c.12c.15c-Octadecatriensäure mit MnO_4^-/JO_4^- (20°).

Substanz	Spaltprodukte in Mol/Mol Ester						
	Propion-säure	Capron-säure	Önanth-säure	Malon-säure	Pimelin-säure	Kork-säure	Azelain-säure
(a) 9c.12c-Octadecadiensäuremethylester	—	0,93	—	0,92	0,002	0,02	0,98
(b) 8c.11c-Octadecadiensäuremethylester	—	—	0,92	0,91	0,005	0,97	0,03
(c) 9c.12c.15c-Octadecatriensäuremethylester	0,91	—	—	1,80	0,01	0,02	0,97

Tab. 3. Optimierte Spaltungen von Dien- und Triensäuren. Bedingungen: (a) und (b) 4 Stdn., 0,1 Mol $MnO_4^-/6$ Mole $K_2CO_3/16$ Mole $NaJO_4$ pro Mol Ester, 20°. (c) 4 Stdn., 0,54 Mol $MnO_4^-/9$ Mole $K_2CO_3/24$ Mole $NaJO_4$ pro Mol Ester, 20°.

Eingesetzte Verbindung	Dicarbonsäuren nach der Spaltung		
	D ₇	D ₈	D ₉ [Mol-%]
Linolsäure-methylester	2,4	3,0	94,6
Linolensäure-methylester	3,1	1,7	95,2

Tab. 4. Ozonolytische Spaltung von Polyensäure-methylestern mit anschließender oxydativer Spaltung der Ozonide (unter ausschließlicher Berücksichtigung der Dicarbonsäuren).

Verteilung von Malonsäure und Nachweis als Methylester

Um bei Spaltansätzen auch die Malonsäure als Oxydationsprodukt der Gruppierung



zu erfassen, wurde zunächst deren Verteilungskoeffizient zwischen Äther und Wasser bestimmt. Die Ergebnisse gibt die Tab. 5 wieder.

Verhältnis Äther/Wasser		Einwaage	Auswaage	Auswaage
		[mg]	Ätherph. [mg]	Wasserph. [mg]
1:1	1. Extr.	606,1	52,1	554,0
	2. Extr.		50,0	504,0
10:1	1. Extr.	426,1	269,0	157,1
	2. Extr.		100,0	57,1

Tab. 5. Verteilung von Malonsäure zwischen Äther und Wasser.

Die Tabelle zeigt, daß bei zweifacher Verteilung zwischen 10 Tln. Äther und einem Tl. Wasser 88% der Malonsäure mit Äther extrahierbar sind.

Berücksichtigt man diese Ausbeute sowie die relative Anzeige des Malonsäuredimethylesters im FI-Detektor bei der gaschromatographischen Auswertung der Spaltprodukte der $\text{MnO}_4^\ominus/\text{JO}_4^\ominus$ -Spaltung, so erhält man eine fast quantitative Übereinstimmung der gefundenen mit der zu erwartenden Menge Malonsäure. Durch Veresterung mit Diazomethan läßt sich Malonsäure als Methylester an den Säulen (3) und (4) bei 160° quantitativ bestimmen.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für die Unterstützung dieser Arbeit.

Diskussion

Die Optimierung der oxydativen Spaltung mit $\text{MnO}_4^\ominus/\text{JO}_4^\ominus$ von Dien- und Trienfettsäuren zeigt, daß die Zusammensetzung der Spaltstücke und damit der Wert der Methode neben dem pH-Wert erwartungsgemäß ganz wesentlich von der Reaktionsdauer und der Permanganatmenge abhängt. Obgleich die Spaltung quantitativ verläuft, beobachtet man eine Überoxydation von maximal 1,5–1,7 Prozent. Damit gestattet das Verfahren Isomere neben einer Hauptkomponente nachzuweisen, sofern der Gehalt an diesen $\geq 2\%$ ist. Die Mono- und Dicarbonsäuren der Spaltung stimmen gut überein.

Bei Berücksichtigung des Verteilungskoeffizienten von Malonsäure im System Äther – Wasser läßt sich die bei der Spaltung von Fettsäuren häufig vorkommende Gruppierung $= \text{CO} - \text{CH}_2 - \text{CH} =$ zu ca. 90% als Malonsäure fassen.

Vergleichsweise wurde sowohl Linol- als auch Linolensäuremethylester der ozonolytischen Spaltung unterworfen. Die Resultate mehrerer Spaltansätze unter üblichen, allerdings nicht optimierten Bedingungen zeigten nach oxydativer Spaltung der Ozonide mit H_2O_2 /Eisessig bei 37° neben Azelainsäurehalbester zahlreiche nicht weiter identifizierte Komponenten, deren Anteil bis zu 50% ausmachen kann. Betrachtet man die entstandenen Dicarbonsäuren, so konnten auch hier nach Veresterung mit methanolischer HCl nur 95% Azelainsäuremethylester neben 3,1% Pimelin- und 1,7% Korksäuremethylester gaschromatographisch nachgewiesen werden. Die quantitative Erfassung von Malonsäure ist unter diesen Bedingungen ausgeschlossen. Die hydrierende Spaltung der Ozonide dagegen läßt eine Auswertung der Malonsäure zu.

Die Vorteile der oxydativen Spaltung mit $\text{MnO}_4^\ominus/\text{JO}_4^\ominus$ liegen in ihrer einfachen Durchführung, der exakten Dosierung des Oxydationsmittels und der damit verbundenen sehr begrenzten Überoxydation (ca. 1,5–1,7%), ihres einheitlichen und quantitativen Verlaufs und ihrer guten Reproduzierbarkeit.

Chemilumineszenz von Redoxreaktionen mit molekularem Sauerstoff *

2. Teil: Reaktionskinetische Analyse und analoge Berechnung der Autoxidation des Cysteins in Gegenwart von Cu(II)-Katalysatoren

J. STAUFF und F. NIMMERFALL

Institut für Physikalische Biochemie und Kolloidchemie im Institut für Physikalische Chemie der Universität Frankfurt am Main

(Z. Naturforschg. **24 b**, 1009—1015 [1969]; eingegangen am 5. April 1969)

Um den Mechanismus der Reaktion des Cysteins mit molekularem Sauerstoff in Gegenwart von Komplexen des zweiwertigen Kupfers als Katalysatoren zu ermitteln, wurden Messungen der Chemilumineszenz, der Sauerstoff- und der Cysteinkonzentration in Abhängigkeit von der Zeit vorgenommen. Variation der Konzentration der Reaktionsteilnehmer führte zu Meßergebnissen, die die Aufstellung eines Reaktionsschemas gestattete. Das hieraus abzuleitende System nichtlinearer Differentialgleichungen für die Reaktionsgeschwindigkeiten wurde in einem Analogrechner gelöst, wobei Übereinstimmung zwischen Rechnung und Meßergebnissen sowohl für die Zeitabhängigkeit als auch für die Konzentrationsabhängigkeit gefunden wurde.

Die Untersuchung des zeitlichen Ablaufs der Chemilumineszenz von Oxidationsreaktionen bietet die Möglichkeit, nähere Einblicke in ihren Reaktionsmechanismus zu gewinnen, da die Lichterzeugung eine Funktion der dabei intermediär gebildeten O₂[•]-Radikale ist.

So konnte im 1. Teil der Arbeit¹ nachgewiesen werden, daß die Autoxidation des NaSH und des Cysteins bzw. Glutathions in Gegenwart von Schwermetall-katalysatoren über Sauerstoffradikale verläuft, wobei diese nicht in freier Form auftreten, sondern an Schwermetalle gebunden sind. In dieser Arbeit sollen weitere experimentelle Tatsachen mitgeteilt werden, die zur Aufklärung des Reaktionsmechanismus dienen können. Die Methode der Variation der Konzentrationen der Reaktionsteilnehmer bildet den Ausgang für eine reaktionskinetische Analyse; ein Vergleich dieser Daten mit den Ergebnissen der Simulation des Reaktionsablaufs auf einem Analog-Computer soll dann zeigen, wie weit experimentelle Befunde und Modellrechnungen in Einklang zu bringen sind.

Für die Diskussion der Reaktionsweise der Oxidation mit molekularem O₂ sind zwei Beispiele gewählt worden, die zunächst ein verschiedenes Verhalten vermuten ließen, sowohl in bezug auf den Reaktionsweg als auch auf die Erzeugung der Chemilumineszenz. Das erste Beispiel ist die Reaktion Cystein + O₂ in Gegenwart von Cu(NH₃)₄²⁺, das zweite betrifft die gleiche Reaktion jedoch in Gegenwart von Cu-FMN (FMN = Flavinmononucleotid = Riboflavinphosphat). Bei letzteren rührt die be-

gleitende Chemilumineszenz nicht allein von angeregten O₂-Spezies, sondern auch von im Verlauf der Reaktion angeregtem FMN (bzw. FMN-Cu-Komplex) her.

Experimentelles

Zur Messung des zeitlichen Ablaufs der Chemilumineszenz und der O₂-Konzentration wurde die in l. c.¹ beschriebene Apparatur benutzt. Eine grobe Abtastung der Chemilumineszenz-Spektren wurde mit Kantenfiltern vorgenommen. Eine zu diesem Zweck konstruierte kreisförmige Filterkassette F kann zwischen Meßküvette und Multiplier eingebaut werden. Sie enthält eine Aluminiumscheibe mit zwei Öffnungen für das Arbeiten mit und ohne Filter. Beim Einlegen der Filter durch eine Gewindeöffnung im Kassettentmantel bedeckt der öffnungsfreie Teil der Scheibe den Signalempfänger und dient so als Shutter. Es wurden Filtergläser der Reihen RG, OG, GG, WG der Fa. Schott & Gen., Mainz, verwendet.

Die Lage der Absorptionsbanden wurde durch die Wellenlänge für 50% Durchlässigkeit charakterisiert. Wenn man 2 Filter nacheinander in den Lichtweg bringt, so ist die Differenz der Photonenströme Δi_p proportional der Durchschnittsintensität I_D der Lumineszenz zwischen den Filterkanten. Der Proportionalitätsfaktor hängt von der Differenz der Filtertransmissionen $T_1 - T_2$ und der Empfindlichkeit des Signalempfängers ab. Zur Berechnung wird die mittlere Quantenausbeute des Signalempfängers im betreffenden Intervall benutzt.

Das Fluoreszenzspektrum des FMN wurde mit einem Zeiss PQM II Spektrometer mit Fluoreszenzzusatz ZFM 4 aufgenommen.

Zur Herstellung der Lösungen wurde tridest. Wasser verwendet. Die Substanzen waren von der Qualität

* 8. Mitteilung über die Chemilumineszenz von Oxidationsreaktionen.

¹ J. STAUFF u. F. NIMMERFALL, Z. Naturforschg. **24 b**, im Druck.