

1807. J. Eisenbrand und H. O. Lohrscheid

Untersuchungen von Spaltprodukten, die bei der Milchsäuregärung aus Azofarbstoffen entstehen*)

II. Oxydative Spaltprodukte von Azorubin und Echtrot E, welche aus den reduktiven durch die Einwirkung des Luftsauerstoffs entstehen

Aus dem Chemischen Untersuchungsamt für das Saarland, Saarbrücken

(Eingegangen am 14. Mai 1959)

a) Die Sauerstoffempfindlichkeit der reduktiven Spaltprodukte der Lebensmittelfarbstoffe Azorubin und Echtrot E***)

Eisenbrand und *Pfeil* haben früher beobachtet (1), daß Gäransätze**) mit dem zur Lebensmittelfärbung dienenden Azofarbstoff Azorubin, welche durch die Lebenstätigkeit der Milchsäurebakterien völlig entfärbt worden waren, an der Oberfläche rotgefärbt blieben, und daß auch häufiges Vermischen die Oberflächenfärbung nicht zum Verschwinden brachte, während hingegen der untergerührte Anteil der gefärbten Oberschicht meist mehr oder weniger schnell entfärbt wurde. Sie konnten nachweisen, daß es sich bei diesen roten Verfärbungen an der Oberfläche der Gäransätze nicht um unreduziert gebliebene Farbstoffanteile, sondern um Oxydationsprodukte der im Gäransatz entstandenen reduktiven Spaltstücke der Azofarbstoffe handelte (1, 3). Da die Konzentration dieser Luftoxydationsprodukte, welche sich nur an der Oberfläche der Gäransätze bilden, gering ist, da diese ferner nur einen Bruchteil der Gesamtgärzeit auf die Gärung einwirken, weil die Entstehung der Oxyaminoaphthalinsulfonsäuren*) aus den Azofarbstoffen einige Zeit benötigt, so wurden die Reduktionsprodukte auf chemischem Wege hergestellt, um in den Gäransätzen sofort größere Mengen zur Oxydation zur Verfügung zu haben.

Von den bei der Reduktion der beiden roten Azofarbstoffe Azorubin und Echtrot E entstehenden Oxyaminonaphthalinsulfonsäuren ist die 1-Oxy-2-aminonaphthalin-4-sulfonsäure (OANS), aus Azorubin, am empfindlichsten gegen Luftsauerstoff. Dies tut sich darin kund, daß die OANS nicht nur in basischer und neutraler Lösung mit dem Luftsauerstoff energisch unter Bildung gefärbter Oxydationsprodukte reagiert, sondern auch in saurer, allerdings mit fallendem p_H -Wert zunehmend langsamer (2). Die bei der Reduktion des Echtrot E entstehende 1-Amino-2-oxynaphthalin-6-sulfonsäure (AONS) reagiert dagegen nur noch in neutralem gepuffertem Milieu in merklicher Geschwindigkeit mit dem Luftsauerstoff, in schwach saurem Milieu nur noch in der Hitze. In der Literatur findet man nur Reaktionen der 1-Amino-2-oxynaphthalin-sulfonsäuren mit Luftsauerstoff in alkalischer Lösung beschrieben (2, 4).

*) Auszug aus der Dissertation von *Hans Otto Lohrscheid*, Saarbrücken 1959.

**) Die Beschreibung der Herstellung der Gäransätze sowie eingehendere Angaben über die Reduktion der untersuchten Azofarbstoffe befinden sich im I. Teil (siehe voranstehende A. beil.).

***) Herrn Direktor Dr. *Raab*, Leverkusen, möchten wir für die freundliche Überlassung der Azofarbstoffe auch an dieser Stelle bestens danken.

Messungen ergaben, daß zur vollständigen Oxydation der AONS in stark alkalischer Lösung bei fortwährendem Schütteln und einem Angebot von überschüssigem Luftsauerstoff eineinhalb Stunden nötig sind. Unter den gleichen Bedingungen ist die Oxydation der OANS aber in 2—3 Minuten beendet. In dieses Bild passen auch die typischen Reduktionseigenschaften (5) der OANS, die wesentlich ausgeprägter sind als die der anderen Säuren: *Tillmans' Reagens* (6), Dichlorphenol-indophenol, wird von OANS in saurer Lösung praktisch momentan reduziert, was sich hier in einem spontanen Farbwechsel von bordeaurrot nach orangerot kundtut.

Über die bei der Luftoxydation der 1-Oxy-2-aminonaphthalin-4-sulfonsäure (OANS) entstehenden Produkte ist wenig bekannt. *Reverdin* und *de la Harpe* erhitzen OANS in sodaalkalischer Lösung an der Luft (2) und beobachteten, daß die zunächst grüne Lösung sich dunkel färbte und ein violettes Pulver abschied. Die von den Autoren mitgeteilten Farberscheinungen lassen sich gut reproduzieren. Um die Abhängigkeit der Luftoxydation der OANS vom p_H -Wert genauer festzulegen, wurden Oxydationen in Pufferlösungen mit p_H -Werten von 2,0, 3,0 steigend bis 12,0 durchgeführt. Es zeigte sich, daß sich das genannte violette Produkt erst oberhalb p_H 9 zu bilden vermag. Es kann also bei den hier untersuchten Milchsäuregärungen nicht auftreten und wurde deshalb nicht weiter untersucht. Zwischen p_H 8 und 6 sind die oxydierten Lösungen dunkel rotbraun gefärbt; mit abnehmendem p_H -Wert hellen sie sich auf und lassen ein rotschwarzes Produkt ausfallen, das abfiltriert und weiter untersucht wurde.

Es handelt sich dabei um das Produkt, das in alkalischer Lösung die von *Reverdin* und *de la Harpe* beobachtete (2) Grünfärbung der Oxydationslösung bewirkt. Fügt man nämlich zu einer Aufschlammung des roten Produkts — es ist in Wasser schwer löslich — langsam $\frac{n}{10}$ Kalilauge, so tritt ein Farbumschlag von Rot über Violett nach tief Dunkelgrün ein, der durch Zugabe von $\frac{n}{10}$ Säure rückgängig zu machen ist; hierbei geht das Produkt in Lösung, um beim Ansäuern wieder auszufallen. Dieses Produkt soll in Zukunft „die rote Substanz“ genannt werden. Papierchromatographisch läßt sich „die rote Substanz“ mit *Thaler-Lösung* (7) nicht in mehrere Bestandteile auftrennen (vgl. dagegen Abb. 3). Die Einwirkung saurer Entwickler auf dieses Produkt führte wegen seiner Schwerlöslichkeit zunächst zu keinem eindeutigen Ergebnis. Reduziert man die rote Substanz in neutralem oder leicht alkalischem Milieu mit Zinkstaub oder anderen Reduktionsmitteln, so entsteht eine hellgelbe, nicht fluoreszierende Lösung, die sich sofort von der Oberfläche her reoxydiert. Durch die Reduktion gelangt man also nicht mehr zur OANS zurück.

Messungen, die analog denen von *Straus*, *Bernouilly* und *Mautner* (8), aber mit einem Wassermanometer als Anzeigegerät ausgeführt wurden, ergaben, daß bei der Luftoxydation von 1 Molekül OANS gerade $\frac{1}{2}$ Molekül O_2 verbraucht wird, gleichgültig, ob man in neutralem oder basischem Milieu arbeitet. Nach dem Ansäuern scheiden sich zwischen 70% und 75% des Gewichts der Einwaage an OANS in Form der roten Substanz unlöslich ab. Eine Reihe von Versuchen zeigte, daß diese Ergebnisse reproduzierbar sind.

Die elektrometrische Titration mit Kalilauge ergab, daß die rote Substanz pro 2 Moleküle OANS nur noch eine titrierbare OH-Gruppe enthält. Ferner fluoresziert sie nicht.

Weiterhin ist folgende Tatsache beachtenswert: Bei der Luftoxydation der OANS wird spontan ein Teil der vorhandenen Sulfonsäuregruppen abgespalten. Aus dem Oxydationsprodukt „rote Substanz“ kann man weiterhin Sulfonsäuregruppen eliminieren, wenn man sie in alkalischer Lösung stehen läßt oder erwärmt. Dies steht im Einklang damit, daß bekanntlich (9, 10) Sulfonsäuregruppen mehr oder weniger leicht abgespalten werden, aber auch eingeführt werden können (13). Dem qualitativen Nachweis der spontanen Abspaltung von Sulfonsäuregruppen in wäßrigen Lösungen wurde besonderes Gewicht beigelegt, da die Sulfonsäuregruppen in der Molekel, wie schon *P. Ehrlich* erkannt (10, 11, 12) eine entgiftende Wirkung im Zellgeschehen haben. Die konsequente Übertragung dieser Vorstellung auf Lebensmittelfarbstoffe führte *Hecht* und *Wingler* (14) zu der Forderung, daß nicht nur die Farbstoffe selbst, sondern auch alle ihre Spaltstücke Sulfonsäuregruppen tragen sollten. Unter diesen Gesichtspunkten gewann die spontane Abspaltung von Sulfonsäuregruppen besondere Bedeutung.

Zunächst wurden die Sulfonsäuregruppen in der Oxydationslösung der OANS als BaSO_4 nachgewiesen. Nach beendeter Luftoxydation in neutralem bis schwach alkalischem Medium wurde mit HCl angesäuert und die ausgeschiedene rote Substanz abfiltriert. Im Filtrat scheidet sich nach Zugabe von BaCl_2 -Lösung ein weißer Niederschlag ab, der abfiltriert und mit Alkohol gewaschen wird; er ist in siedender konz. HCl unlöslich und weist sich mittels Heparprobe als BaSO_4 aus. Ein weiterer Nachweis der Abspaltung von Sulfonsäuregruppen wurde papierchromatographisch erbracht:

Als Entwickler diente Thaler-Lösung, Dauer 4 Stunden. Die Säuren wurden durch Anfärben mit einer Lösung, bestehend aus 5 Teilen einer 0,1%igen Bromphenolblaulösung und 15 Teilen Phosphatpuffer, $\text{pH} = 7,0$ (15) und Bestrahlen mit einem Infrarot-Bestrahlungsgerät sichtbar gemacht. Die als Ammoniumsalze wandernden Säuren (15) werden dadurch in Freiheit gesetzt und reagieren mit dem Indikator. Die schraffierten Flecken sind tiefgrün (rote Substanz) bzw. orange-rot (Zersetzungsprodukte der roten Substanz) gefärbt. Man bemerkt, daß die rote Substanz unter diesen Bedingungen (5%iges Ammoniak) noch keine Sulfonsäuregruppen abspaltet, wohl aber die OANS.

Es zeigte sich bei wiederholten Versuchen jedesmal in der Höhe des Leitchromatogramms ein intensiver Schwefelsäurefleck, der nur von den bei der Luftoxydation der OANS abgespaltenen Sulfonsäuregruppen herrühren konnte.

Lösungsmittelfront

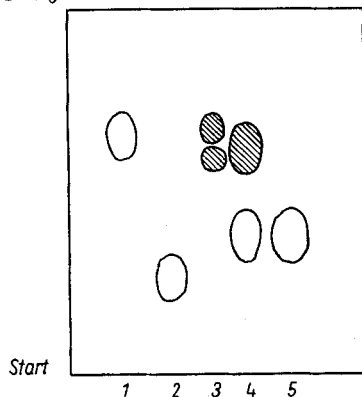


Abb. 1. Abspaltung der Sulfonsäuregruppe bei der Luftoxydation der 1-Oxy-2-aminonaphthalin-4-sulfonsäure (OANS)

1. Salzsäure.
2. Natriumbisulfid.
3. Die nach der Luftoxydation der OANS isolierte rote Substanz (unterer Fleck) und ihre Zersetzungsprodukte (oberer Fleck).
4. OANS; diese zersetzt sich während der Entwicklung des Chromatogramms; unter Abspaltung von Sulfonsäuregruppen entsteht die rote Substanz (schraffiert).
5. Natriumsulfat.

Als weiteres Kriterium wurde die Änderung der spezifischen Leitfähigkeit κ in der Zeiteinheit während der Luftoxydation der OANS gemessen. Diese sollte auch weitere Einblicke in die Art der Reaktion vermitteln. Die Dimension von κ in den Tabellen 1 und 2 und Abbildung 2 ist $\text{Ohm}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Da die Ausgangsleitfähigkeit, die durch die Lösung des Na-Salzes der OANS bewirkt wird, zu hoch ist, um die geringen Effekte der Abspaltung der Sulfonsäuregruppe zu bemerken,

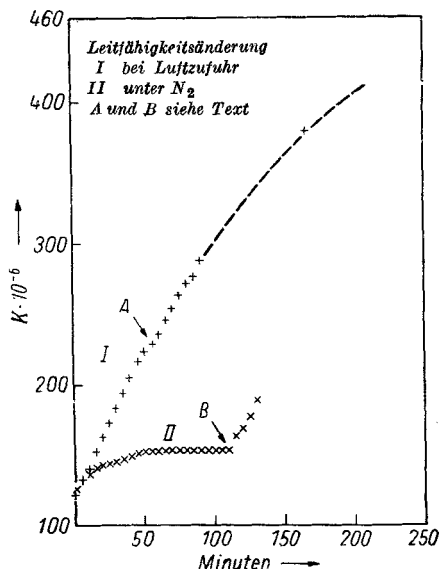


Abb. 2. Leitfähigkeitsänderung der 1-Oxy-2-aminonaphthalin-4-sulfonsäure in wässriger Lösung

wurde in einer gesättigten wässrigen Lösung der Säure oxydiert. Der Überschuß an OANS, der sich in Wasser nicht löste, wurde abfiltriert und ausgewogen; es lösten sich 86,2 mg OANS in 200 ml Wasser von 20° C. Zur Messung diente eine Philips-Universalmeßbrücke „Philoscop II“ GM 4144. Ihr Meßbereich ist von 0,5 Ohm bis 10 Megohm, die Meßgenauigkeit in den hier benötigten Bereichen 0,3 bis 0,8%. Verwendet wurden platiniierte Elektroden. Abbildung 2 zeigt die Leitfähigkeitsänderung mit der Zeit beim stetigen Durchleiten von Luft durch eine Lösung von 86,2 mg OANS in 200 ml Wasser bei 20° C.

Das zur Lösung der OANS dienende Wasser war vorher unter den Bedingungen der Oxydation mit Luft gesättigt worden; bei der Lösung der OANS ist daher schnelles Arbeiten notwendig, das erst nach einer Reihe von Versuchen erlangt werden konnte. An diesen Versuchen konnte, abgesehen von der vergrößerten Ausgangsleitfähigkeit, stets derselbe Verlauf der Leitfähigkeitszunahme beobachtet werden. Die Lösung zeigte zu Beginn einen elektrometrisch gemessenen p_H -Wert von 3,25.

Die Abbildung 2 zeigt einen Anstieg der Leitfähigkeit mit der Zeit, wenn durch die Lösung Luft durchgeleitet wird (I).

Nach 45 Minuten beginnt sich die beschriebene rote Substanz abzuscheiden (A), der Leitfähigkeitsanstieg setzt sich jetzt etwas langsamer fort und nimmt schließlich immer weniger zu. Offenbar strebt die Leitfähigkeit einem Grenzwert zu. Dieser müßte erreicht sein, wenn gerade auf 2 Moleküle ONAS 1 Molekül Schwefelsäure abgespalten wurde.

Es entsprechen nämlich der eingewogenen Menge OANS von 86,2 mg bei Abspaltung von 1 Sulfonsäuregruppe aus 2 Molekülen 17,9 mg Schwefelsäure.

Die Leitfähigkeit für diese läßt sich aus der folgenden Tabelle 1 zu $\kappa \cdot 10^{-6} = 460,3$ extrapolieren. Dieser Wert ist als Grenzwert der höchsten durch Abspaltung der Schwefelsäure erreichbaren Leitfähigkeit in Abb. 2 als Gerade eingetragen. Diesem Wert muß sich die Leitfähigkeit bei der Spaltungsreaktion schließlich asymptotisch annähern. Dies ist durch die gestrichelte Linie in der Abbildung zum Ausdruck gebracht.

Tabelle 1

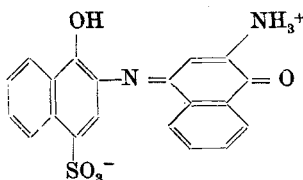
Abhängigkeit der Leitfähigkeit vom Gehalt einer Lösung an H_2SO_4

mg H_2SO_4 in 200 ml Wasser	$\kappa \cdot 10^{-6}$
0	118,8
0,915	136,2
3,652	154,9
1,827	188,8
5,472	225,9
7,290	259,8
9,102	296,4
12,72	363,1
16,35	430,0

Der entsprechende Versuch unter Stickstoff (II) war beeinflusst durch die Schwierigkeit, daß sich ein Rest Luft aus der Tauchelektrode nicht entfernen ließ. Dies zeigt sich in der durch den Rest Luftsauerstoff bewirkten anfänglichen geringen Leitfähigkeitszunahme auch unter Stickstoff. Ist dieser Luftrest verbraucht, so tritt Konstanz der Leitfähigkeit ein, wodurch sich II markant von I unterscheidet. Nach 115 Minuten (bei B) wurde der Stickstoff durch Luft verdrängt, worauf die Leitfähigkeit analog I zuzunehmen begann.

Die Leitfähigkeitszunahme bei der Abspaltung der Sulfonsäuregruppe kann durch Entstehung von Schwefelsäure erklärt werden. Denn da diese im Gegensatz zur einbasigen Sulfonsäure zweibasig ist, so treten durch diese Abspaltung zusätzliche Ladungsträger auf, wobei gleichzeitig Wasser und der Sauerstoff der Luft mitwirken.

Wahrscheinlich kondensiert das Molekül, aus welchem die Sulfonsäuregruppe abgespalten wird, mit einem noch unveränderten Molekül OANS zu einem Indonaphthol, für welches wir vorläufig folgende Konstitution annehmen möchten:



Wenn man die Lufzufuhr unterbricht, hört die Leitfähigkeitszunahme wieder auf.

Dies zeigt, daß Hydrolyse der Sulfongruppe und Oxydation praktisch gekoppelt erfolgen.

Da bei der Reaktion der Reaktionspartner H_2O im Überschuß vorhanden ist, so kann seine Konzentration während des Vorganges als konstant angesehen werden. Das gleiche gilt für den Sauerstoff der durchgeleiteten Luft. Daraus ergibt sich, daß der Abspaltungsvorgang, obwohl mehrere Molekülararten beteiligt sind, formal durch die kinetische Gleichung für eine monomolekulare Reaktion dargestellt werden sollte. Die Reaktion ist dann unter den gegebenen Konzentrationsverhältnissen „pseudomonomolekular“.

Die Reaktionsgleichung für eine monomolekulare Reaktion lautet

$$\frac{-\lg(1-\alpha)}{Z} = k$$

Hierin bedeuten: Z die Zeit in Minuten und α den Bruchteil zersetzter OANS, $(1 - \alpha)$ den zur Zeit noch vorhandenen Bruchteil OANS, k ist, wenn die Gleichung erfüllt ist, eine Konstante.

Der Bruchteil α kann, da man die Leitfähigkeit der gesamten abspaltbaren Schwefelsäure kennt, wie folgt ermittelt werden:

Der Grenzwert der Leitfähigkeit für die gesamte abspaltbare Schwefelsäure ist 460,3. Hieraus ergibt sich unter Abzug der Leitfähigkeit des Lösungsmittels $\Delta \kappa_{\text{H}_2\text{SO}_4} = (460,3 - 118,8) = 341,5$. Ebenso ermittelt man die $\Delta \kappa$ -Werte für die wäßrigen Lösungen des OANS für die verschiedenen Zeiten ($\Delta \kappa$ OANS). Da nur die Hälfte der anfänglich in der OANS verfügbaren Schwefelsäure abgespalten wird, so ist der abgespaltene Bruchteil aus OANS

$$\alpha = \frac{\Delta \kappa (\text{OANS})}{2 \Delta \kappa_{\text{H}_2\text{SO}_4}}$$

Die Tabelle 2 zeigt die Prüfung der Reaktionsgleichung.

Tabelle 2

Prüfung der Gleichung für eine monomolekulare Reaktion für die Schwefelsäureabspaltung aus 1-Oxy-2-Naphthylamino-4-sulfonsäure (I)

Zeit	$\Delta \kappa \text{ OANS}$	α	$1 - \alpha$	$1000 \cdot k$
0	0	0,00	1,000	—
5	11,9	0,017	0,983	1,48
10	19,9	0,029	0,971	(1,28)
15	32,7	0,048	0,952	1,43
20	43,7	0,064	0,936	1,43
25	54,0	0,080	0,920	1,45
30	63,5	0,093	0,907	1,41
35	74,2	0,109	0,891	1,43
40	86,0	0,126	0,874	1,46
45	96,0	0,141	0,859	1,47
50	103,2	0,151	0,849	1,42
55	107,9	0,158	0,842	1,36
60	116,3	0,170	0,830	1,35
65	126,4	0,185	0,815	1,37
70	134,3	0,197	0,803	1,36
75	143,6	0,210	0,790	1,39
80	151,2	0,221	0,779	1,36
85	159,6	0,234	0,766	1,37
90	169,3	0,248	0,752	1,38
165	261,1	0,383	0,617	(1,27)
Mittel:				1,40

Man ersieht, daß k eine befriedigende Konstanz zeigt.

Die größten Abweichungen zeigen die Werte 1,28 und 1,27. Der erstere ist aus einer relativ kleinen Leitfähigkeitserhöhung ermittelt, diese Abweichung liegt also innerhalb der möglichen Fehlergrenzen.

Der zweite Wert von 1,27 ergibt sich aus der größten gemessenen Leitfähigkeits-erhöhung gegen Ende der Reaktion. Hier ist die Leitfähigkeitsmessung daher mit der geringsten Fehlermöglichkeit behaftet, es handelt sich daher um eine reale Abweichung von k vom Mittelwert.

Sie erklärt sich wie folgt: Da der für den Verlauf der Reaktion maßgebende zur jeweiligen Zeit noch vorhandene Anteil OANS nicht direkt, sondern indirekt aus der gebildeten Schwefelsäure durch Bildung der Differenz $(1 - \alpha)$ ermittelt wird, so wird die jetzt bereits merkliche Mengen von OANS verbrauchende Kondensation zum Indonaphthol nicht berücksichtigt. Also ist das als $(1 - \alpha)$ ermittelte OANS jetzt zu groß. Dann wird aber nach der Gleichung k zu klein.

Damit ist erwiesen, daß die Gleichung der monomolekularen Reaktion streng nur in den ersten 100 Minuten mit Hilfe solcher indirekter Konzentrationsbestimmungen von OANS aus der Leitfähigkeit erwiesen werden kann, da nur bis dahin die Kondensation zum Indonaphthol mengenmäßig bei der Berechnung zu vernachlässigen ist.

Ein Gang von k von sekundärer Größe während der gesamten Reaktionszeit von größeren nach kleineren Werten kann mit dem Ausfällen der roten Substanz zusammenhängen (siehe auch I, A).

Die rote Substanz ist wahrscheinlich nach all diesen Feststellungen nicht ganz einheitlich. Ihre schwere Löslichkeit erschwert ihre Reinigung sehr. Versuche dazu sind im Gang. Es läßt sich jedoch mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit annehmen, daß der Hauptbestandteil der roten Substanz ein Indonaphthol (siehe S. 713) ist aus folgenden Gründen:

Etwa 90% der eingewogenen OANS werden nach der Luftoxydation und Schwefelsäureabspaltung als „rote Substanz“ gewonnen (bezogen auf OANS — $1/2$ SO_3H).

Bei der Luftoxydation konnte eine teilweise Abspaltung der Sulfonsäuregruppen nachgewiesen werden. Leitfähigkeitsmessungen machen die Abspaltung der Hälfte des Anteils der Sulfonsäuregruppe wahrscheinlich. Die andere Hälfte entzieht sich der weiteren Abspaltung durch Kondensation des Moleküls zur „roten Substanz“. Diese enthält nur noch 1 titrierbare OH-Gruppe pro 2 ursprüngliche Moleküle OANS.

Es ist daher sehr wahrscheinlich, daß der Kondensationsvorgang unter Luftzutritt in der Hauptsache in dem Zusammentritt zweier Moleküle OANS zu einem Indonaphthol unter Abspaltung von einer Sulfongruppe pro zwei Moleküle OANS unter Oxydation besteht. Somit ist nach Tabelle 2 die Halbwertszeit dieser Reaktion bei $p_{\text{H}} = 3,25$, für $\alpha = 0,25$ etwa 90 Minuten.

Daß die in alkalischer Lösung gewonnene rote Substanz jedoch nicht ganz einheitlich ist, zeigt das folgende Chromatogramm (Abb. 3).

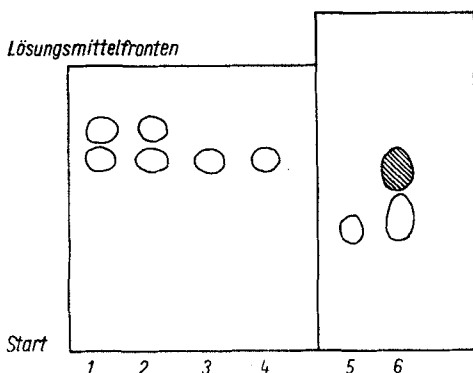


Abb. 3. Chromatographische Trennung der roten Substanz in 2 Komponenten

Das linke Chromatogramm wurde mit Patridge-Gemisch entwickelt, dem soviel Eisessig zugefügt worden war, daß die Phasentrennung aufgehoben wurde. Dauer 8 Stunden. Rechts Entwicklung mit Thaler-Lösung. Dauer 5 Stunden.

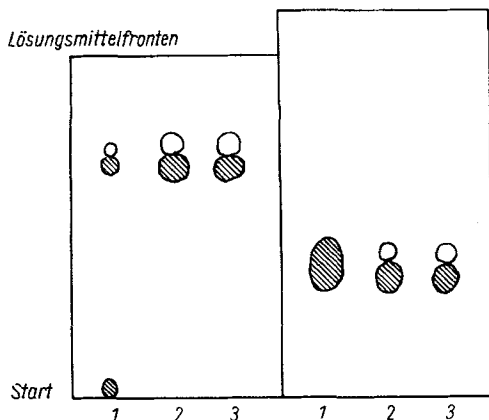


Abb. 4. Die bei der Luftoxydation der 1-Oxy-2-aminonaphthalin-4-sulfonsäure entstehende rote Substanz und ihre Zersetzungsprodukte

Die rote Substanz, die mittels Luftoxydation der OANS in alkalischer Lösung gewonnen wurde, läßt sich in 2 Komponenten zerlegen (1, 2), die sich hinsichtlich ihrer Farbreaktionen gegen Säuren und Basen gleich verhalten. Extrahiert man die rote Substanz mehrfach mit 10%iger Essigsäure, so geht ein Teil langsam in Lösung. Die verbleibende rote Substanz hat einen geringeren R_f -Wert (3, 4). Der mit Essigsäure in Lösung gegangene Anteil zeigt, mit Thaler-Lösung entwickelt (5), einen etwas geringeren R_f -Wert als die nicht extrahierte rote Substanz (6). Eine Trennung der roten Substanz in ihre Komponenten ist mit Thaler-Lösung nicht möglich (6). Schraffiert: Orangerote Zersetzungsprodukte der roten Substanz.

Abb. 4: 1. Isolierte rote Substanz nach der Luftoxydation der OANS.

2, 3. Die rote Substanz wurde mit Zinkstaub reduziert; an der Luft bildet sich ein Produkt zurück, daß sich in seinen Farbreaktionen gegen Basen und Säuren nicht von dem Ausgangsprodukt unterscheidet. Schraffiert: Rote Substanz, unschraffiert: Zersetzungsprodukt der roten Substanz.

Im sauren Milieu bleibt der größte Teil der roten Substanz ungelöst am Start sitzen (linkes Chr. 1). Nach der Reduktion und Reoxydation ist hier seine Löslichkeit wesentlich verbessert; auch nimmt die Menge der orangeroten Zersetzungsprodukte zu (2, 3). Im basischen Milieu (rechtes Chr.) zeigt die rote Substanz vor der Behandlung mit Zinkstaub eine bessere Löslichkeit als hinterher. Zersetzungsprodukte

zeigen sich hier erst nach der Reduktion und Reoxydation.

Das linke Chromatogramm wurde mit einer Lösung von 10% Eisessig, 10% Äthanol und 80% Wasser 4 Stunden entwickelt, das rechte ebensolang mit Thaler-Lösung.

Eigenschaften der roten Substanz: Sie spaltet beim Erwärmen in neutraler und alkalischer Lösung langsam, schneller beim Kochen ihre noch verbliebene Sulfonsäuregruppe ab. Läßt man sie in schwach alkalischer Lösung (p_H nicht über 9) einige Zeit stehen und säuert dann wieder an, so fällt erneut ein rotes Produkt aus. Dieses unterscheidet sich jedoch in seiner Löslichkeit von der ursprünglichen roten Sub-

stanz. Es ist in saurer Umgebung besser, in alkalischer schlechter als diese löslich (siehe Abb. 3), wahrscheinlich infolge des Verlustes weiterer Anteile der Sulfonsäuregruppe.

Reduziert man die rote Substanz mit Zinkstaub und läßt sie sich an der Luft reoxydieren, so zersetzt sich ein Teil zu orangerot gefärbten Produkten (siehe Abb. 4).

Es ist dabei nach den Arbeiten von *Straus* u. Mitarb. (8) wahrscheinlich, daß Naphthochinonderivate eutstehen (16, 17, 18).

Für das Verhalten der roten Substanz in Gäransätzen ergibt sich hieraus folgendes: Sie wird auch bei Gärungen weitere chemische Veränderungen erleiden, und zwar wird sie sich bei Reduktionen und Reoxydationen unter Abspaltung von Schwefelsäure mehr oder weniger zersetzen. Weitere Untersuchungen sollen sich mit der Gewinnung einheitlicher chemischer Stoffe aus der roten Substanz beschäftigen.

b) Die Wirkung der bei der Luftoxydation der 1-Oxy-2-aminonaphthalin-4-sulfonsäure isolierten roten Substanz auf die Milchsäuregärung

Tabelle 3

Wirkung der roten Substanz auf die Milchsäuregärung unter Stickstoff

Vers. Nr.	Rote Substanz %	Gärzeit Std.	pH	MS*) %	MZ %	β_{MS}	β_{MZ}
1.	0,000	0	6,20	0,225	4,47	—	—
	0,000	24	4,15	0,966	3,72	1,00	1,00
	0,200	24	4,25	0,942	3,75	0,97	0,95
	0,400	24	4,35	0,874	3,86	0,88	0,82
	0,600	24	4,60	0,821	3,94	0,80	0,71
	0,800	24	4,95	0,710	4,06	0,66	0,54
2.	0,000	0	6,20	0,190	4,52	—	—
	0,000	24	4,00	0,923	3,78	1,00	1,00
	0,200	24	4,10	0,899	3,80	0,97	0,97
	0,400	24	4,25	0,851	3,86	0,90	0,89
	0,600	24	4,55	0,783	3,95	0,81	0,77
	0,800	24	5,00	0,667	4,03	0,65	0,66

Die Summe MS % + MZ % ist wie früher**) innerhalb der Fehlergrenzen konstant, womit wieder der homofermentative Charakter der Gärungen erwiesen ist. Für 1. ist die Summe $4,73 \pm 0,04\%$, für 2. $4,71 \pm 0,02\%$.

*) MS = Milchsäure, MZ = Milchzucker.

$\beta = \frac{\text{Säurezuwachs bzw. Milchzuckerabnahme im Farbstoffansatz.}}{\text{Säurezuwachs bzw. Milchzuckerabnahme im Ansatz ohne Farbstoff.}}$
Nähere Angaben vgl. Teil I dieser Arbeit.

**) Vgl. Teil I dieser Arbeit.

Die Ansätze waren bis auf den mit 0,8% Zusatz vollständig entfärbt. Aber während der Analyse bildete sich der rote Stoff durch Oxydation an der Luft zurück. Die obigen β -Koeffizienten stimmen befriedigend überein. Sie zeigen, daß die rote Substanz nur mäßige Hemmwirkung ausübt, die in der Größenordnung der Hemmungen, wie sie Azorubin selbst verursacht, liegen. Allerdings ist dabei zu beachten, daß die rote Substanz selbst sehr bald durch Reduktion verschwindet, so daß man ihre eigentliche Wirkung so nicht fassen kann.

Milchsäuregärung unter Luftzufuhr

P. Ehrlich zeigt in seiner Arbeit „Über das Sauerstoffbedürfnis des Organismus“ (11), daß reversibel reduzierbare Farbstoffe, die aus der Zelle, in der sie reduziert worden sind, in die Blutbahn herausdiffundieren, dort sofort reoxydiert werden. Dies regte dazu an, das Modell der Milchsäuregärung derart zu modifizieren, daß die durch Milchsäurebakterien reduzierten Farbstoffe bzw. deren Spaltprodukte sofort wieder reoxydiert werden, ähnlich wie dies in der Blutbahn geschieht. So sollte man die Konzentration der Oxydationsprodukte der Spaltstücke der Azofarbstoffe trotz der großen Reduktionskraft der Ansätze auf einer gewissen Höhe halten können und damit Aussagen über die Eigenwirkung derselben erhalten, die dann nicht mehr durch die Wirkung der Reduktionsprodukte überdeckt ist. Hierzu wurde während der Bebrütung ein konstanter, langsamer Luftstrom durch die Gäransätze geleitet. Da nun aber die Mischkulturen zu unterschiedlichen Mengen aus aerophilen und anaeroben Stämmen bestehen (19), konstatiert man im Verhältnis zu Ansätzen, die gleichartig, aber ohne Luftzufuhr bebrütet werden, eine gewisse, sich in begrenztem Rahmen haltende Stimulierung oder Hemmung der Milchsäurebildung. Da die Wirkungen des Luftsauerstoffs aber innerhalb derselben Versuchsserie völlig gleich sind, können die Analysenergebnisse miteinander verglichen werden.

Es sei ferner erwähnt, daß der Schutz solcher belüfteter Ansätze gegen Infektionen mit Hefen schwieriger ist als der unbelüfteter.

So war ein Teil der belüfteten Ansätze nach 24 Stunden bereits in alkoholische Gärung übergegangen; derartige Versuchsreihen mußten verworfen und wiederholt werden. Solche Ansätze, die nur einen geringen Milchzuckerunterschuß in der Stoffwechselbilanz aufwiesen (200—300 mg%), konnten noch zu Aussagen über die Hemmwirkungen herangezogen werden. Diese Versuchsreihen weisen sich durch gegenüber β_{MS} erniedrigte β_{MZ} -Koeffizienten aus.

e) Die Wirkung der Oxyaminonaphthalinsulfonsäuren auf die Gärungen bei Luftzufuhr

1. 1-Oxy-2-aminonaphthalin-4-sulfonsäure (OANS).

Die Tabelle 4 zeigt die Ergebnisse:

Tabelle 4

Wirkung des Na-OANS auf die Milchsäuregärung bei Luftzufuhr

Vers. Nr.	Na-OANS %	Luft	Zeit	pH	MS %	MZ %	β_{MS}	β_{MZ}
1.	0,000	—	0	6,10	0,136	4,92	—	—
	0,000	—	24	4,00	0,843	4,30	—	—
	0,000	+	24	4,65	0,626	4,38	1,00	1,00
	0,200	+	24	5,90	0,185	4,87	0,10	0,09
	0,400	+	24	5,90	0,154	4,88	0,04	0,07
	0,600	+	24	5,85	0,145	4,89	0,02	0,05
	0,800	+	24	5,85	0,147	4,89	0,02	0,05
2.	0,000	—	0	6,15	0,139	4,81	—	—
	0,000	—	24	4,75	0,531	4,38	—	—
	0,000	+	24	4,55	0,568	4,23	1,00	1,00
	0,050	+	24	5,85	0,203	4,67	0,15	0,24
	0,100	+	24	6,00	0,165	4,70	0,60	0,19
	0,240	+	24	6,00	0,157	4,74	0,04	0,10
	0,000	—	0	6,25	0,106	4,66	—	—
3.	0,000	—	24	4,50	0,516	4,27	—	—
	0,000	+	24	4,55	0,523	4,15	1,00	1,00
	0,010	+	24	5,20	0,440	4,26	0,78	0,77
	0,025	+	24	5,55	0,348	4,33	0,58	0,65
	0,050	+	24	5,70	0,248	4,44	0,34	0,43

Die Summe MS % + MZ % ist innerhalb der Fehlergrenze konstant und zwar für 1.) $5,07 \pm 0,07$ %, 2.) $4,88 \pm 0,08$ %, 3.) $4,71 \pm 0,06$ %.

Die Tabelle zeigt, daß die Einwirkung des Luftsauerstoffes auf die OANS Stoffe entstehen ließ, die sehr starke Gärungshemmer sind, während unter Stickstoff die OANS praktisch keine Hemmung ausübt.

Da das Oxydationsprodukt „rote Substanz“ unter N_2 nur verhältnismäßig kleine Hemmwirkungen ausübt, so wurde dieses nunmehr auch den Ansätzen unter Luftzufuhr zugesetzt (Tabelle 5).

2. Die rote Substanz

Tabelle 5

Die Wirkung der roten Substanz auf die Milchsäuregärung unter Luftzufuhr

Vers. Nr.	Rote Substanz %	Gärzeit Std.	Luft	pH	MS %	MZ %	β_{MS}	β_{MZ}
1.	0,000	0	—	6,20	0,133	4,76	—	—
	0,000	24	—	4,40	0,793	3,91	—	—
	0,000	24	+	4,55	0,739	3,99	1,00	1,00
	0,200	24	+	6,10	0,197	4,64	0,11	0,16
	0,400	24	+	6,10	0,185	4,64	0,09	0,16
	0,600	24	+	6,10	0,150	4,66	0,03	0,13
	0,800	24	+	6,20	0,138	4,67	0,01	0,12

Fortsetzung von Tabelle 5

Vers. Nr.	Rote Substanz %	Gärzeit Std.	Luft	PH	MS %	MZ %	β_{MS}	β_{MZ}
2.	0,000	0	—	6,15	0,122	4,20	—	—
	0,000	24	—	4,35	0,578	3,66	—	—
	0,000	24	+	4,45	0,570	3,66	1,00	1,00
	0,010	24	+	5,25	0,476	3,79	0,79	0,80
	0,025	24	+	5,60	0,363	3,92	0,54	0,59
	0,050	24	+	5,75	0,255	4,05	0,29	0,23

Die Summe MS % + MZ % ist für 1.) $4,82 \pm 0,12\%$, für 2.) $4,28 \pm 0,05\%$.

Die Bestimmungen des Milchzuckers, besonders in den konzentrierteren Lösungen sind durch gefärbte Oxydationsprodukte erschwert. Aus dem Vergleich der Werte von Tabelle 4 mit denen der Gärungen unter N_2^*) ergibt sich, daß die gärungshemmenden Wirkungen der 1-Oxy-2-aminonaphthalin-4-sulfonsäure bei Luftzufuhr erheblich sind. Unter den gleichen Bedingungen übt auch der Zusatz von roter Substanz zu den Gäransätzen starke Hemmwirkungen aus. Beide Zusatzstoffe hemmen etwa in gleicher Größenordnung.

Es ist daher anzunehmen, daß aus beiden Zusatzstoffen schließlich dieselben stark hemmenden Endprodukte entstehen.

3. Die Wirkung der 1-Amino-2-oxynaphthalin-6-sulfonsäure (AONS) unter Luftzufuhr auf die Milchsäuregärung

Die bei der Reduktion des Echtrot E entstehende AONS verhält sich bei der Luftoxydation ganz anders als die OANS aus dem Azorubin. Mittels Wassermanometer wurde, wie früher beschrieben, festgestellt, daß die AONS zur vollständigen Oxydation die doppelte Menge Sauerstoff aufnimmt wie die OANS, nämlich 1 Molekül O_2 pro Molekül AONS. Im neutralen oder alkalischen Milieu tritt hierbei Braunfärbung ein, wie dies von *Reverdin* und *de la Harpe* (2) beschrieben worden ist. Die Bildung einer Zwischenstufe der Oxydation, wie bei der OANS, wird nicht beobachtet. Im stark alkalischen Milieu vermag sich allerdings bei längerem Stehen ein grün gefärbtes Produkt zu bilden, das sich aber hinsichtlich seiner Löslichkeit, Verhalten gegen Säuren usw. als völlig verschieden von der bei der Luftoxydation der OANS entstehenden roten Substanz erweist. Da sich dieses Produkt aber im sauren Gäransatz nicht bilden kann, wurde es nicht weiter untersucht. Vielmehr bilden sich im Gäransatz nur braune Stoffe, deren Farbe beim stärkeren Ansäuern nach Rot umschlägt. Chromatographisch ist eine Auftrennung in mehrere Oxydationsprodukte nicht möglich (vgl. Abb. 5).

Eine Abspaltung von Sulfonsäuregruppen während der Luftoxydation wird nicht beobachtet. Mißt man die Leitfähigkeit einer wäßrigen Lösung von AONS bei Luftzutritt unter den gleichen Bedingungen, wie früher (Seite 712) beschrieben, so ändert sich diese über Stunden nicht. Auch mit den anderen dort beschriebenen

*) Vgl. Teil I dieser Arbeit.

Methoden läßt sich kein abgespaltenes Sulfat nachweisen. Aus all diesen Gründen ist anzunehmen, daß die Luftoxydation der AONS direkt zu Derivaten von Naphthochinon- bzw. Oxynaphthochinonsulfonsäuren führt.

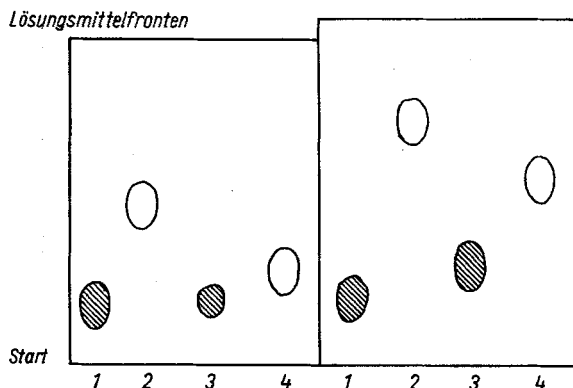


Abb. 5. Nachweis, daß die nach Reduktion des Azorubins und Ehtrot E durch Luftoxydation entstehenden Substanzen nicht mit den Ausgangsfarbstoffen identisch sind

1. Azorubin.
2. Die bei der Luftoxydation der 1-Oxy-2-aminonaphthalin-4-sulfonsäure entstehende rote Substanz.
3. Ehtrot E.
4. Das bei der Luftoxydation der 1-Amino-2-oxynaphthalin-6-sulfonsäure entstehende Produkt.

Das linke Chromatogramm wurde 5 Stunden in 3%iger Essigsäure entwickelt, das rechte 4 Stunden in Thaler-Lösung. Die unreduzierten Azofarbstoffe sind schraffiert gezeichnet.

Tabelle 6 gibt die Analysen von Gäransätzen mit 1-Amino-2-oxynaphthalin-6-sulfonsaurem Natrium unter Einleiten von Luft wieder.

Tabelle 6

Die Wirkung des Na-AONS auf die Milchsäuregärung unter Luftzufuhr

Vers. Nr.	Na-AONS %	Luft	Gärzeit Std.	pH	MS %	MZ %	β_{MS}	β_{MZ}
1.	0,000	—	0	6,15	0,131	4,93	—	—
	0,000	—	24	4,00	0,843	4,21	—	—
	0,000	+	24	4,15	0,797	4,17	1,00	1,00
	0,200	+	24	5,95	0,178	4,83	0,07	0,13
	0,400	+	24	6,00	0,158	4,85	0,04	0,10
	0,600	+	24	6,00	0,145	4,83	0,02	0,13
	0,800	+	24	5,95	0,151	4,84	0,03	0,12
2.	0,000	—	0	6,15	0,139	4,81	—	—
	0,000	—	24	4,75	0,531	4,38	—	—
	0,000	+	24	4,55	0,568	4,23	1,00	1,00
	0,050	+	24	5,25	0,358	4,49	0,51	0,55
	0,100	+	24	5,40	0,235	4,63	0,22	0,31
	0,200	+	24	5,70	0,160	4,74	0,05	0,12
	0,400	+	24	5,85	0,145	4,83	0,01	0,00

Vers. Nr.	Na-OANS %	Luft	Gärzeit Std.	PH	MS %	MZ %	β_{MS}	β_{MZ}
3.	0,000	—	0	6,25	0,106	4,66	—	—
	0,000	—	24	4,50	0,516	4,27	—	—
	0,000	+	24	4,55	0,523	4,15	1,00	1,00
	0,010	+	24	4,65	0,488	4,18	0,92	0,77
	0,025	+	24	5,15	0,440	4,28	0,80	0,75
	0,050	+	24	5,60	0,379	4,49	0,66	0,33

Die Summe MS % + MZ % ist für 1.) $5,01 \pm 0,05$ %, für 2.) $4,88 \pm 0,08$ %, für 3.) $4,75 \pm 0,12$ %.

Auch hier entstehen also bei Luftzufuhr, wie die β -Werte der Tabelle zeigen, starke Gärungshemmer, während, wie früher gezeigt wurde, die AONS und die OANS unter Stickstoff keine Hemmwirkung ausüben. Zu erwähnen ist hier noch, daß das reduktive Spaltungsprodukt Naphthionsäure auch bei Luftzufuhr keine Gärungshemmung bewirkt*).

Zusammenfassung

Aus den durch Luftsauerstoffzufuhr in den Gärungsansätzen oxydierten Spaltprodukten von Azofarbstoffen, nämlich 1-Oxy-2-aminonaphthalin-4-sulfonsäure, (OANS) aus Azorubin, und 1-Amino-2-oxy-naphthalin-6-sulfonsäure, (AONS) aus Echtrot E entstehen starke Gärungshemmer.

Die genannten Säuren selbst sind unter Stickstoff praktisch wirkungslos, wie früher gezeigt wurde. Naphthionsäure ist sowohl unter Stickstoff als auch bei Luftzufuhr praktisch wirkungslos.

Literatur

- (1) J. Eisenbrand und D. Pfeil, *Naturwissenschaften* 42, 97 (1955).
- (2) F. Reverdin und Ch. de la Harpe, *Ber. dtsh. chem. Ges.* 25, 1400 (1892).
- (3) J. Eisenbrand und A. Klawick, *Z. f. Lebensmittelunters. und -Forschung* 108, 225 (1958).
- (4) E. Bamann und E. Link, *Chemiker-Zeit.* 78, 499, 530, 577 (1954).
- (5) H. v. Euler und B. Eistert, *Chemie und Biochemie der Reduktone*, Ferd. Enke Verlag, Stuttgart 1957, Seite 8—9.
- (6) J. Tillmans, *Z. f. Unters. der Lebensmittel* 54, 33 (1927) und 63, 1 (1932).
- (7) H. Thaler und G. Sommer, *Z. f. Lebensmittelunters. und -Forschung* 97, 345 (1953).
- (8) F. Straus, O. Bernouilly und P. Mautner, *Liebigs Ann. Chem.* 444, 165 (1925).
- (9) P. Seidel, *Ber. dtsh. chem. Ges.* 25, 423 (1892).
- (10) P. Ehrlich, *Gesammelte Arbeiten*, 1. Band, Springer Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1956, Seite 517ff.
- (11) P. Ehrlich, *ebenda*, S. 364ff.
- (12) P. Ehrlich, *ebenda*, Seite 552ff.
- (13) M. Böninger, *Ber. dtsh. chem. Ges.* 27, 23 (1894).
- (14) G. Hecht und A. Wiegler, *Arzneimittelforschung* 2, 192 (1952).
- (15) A. Grüne, *Papierchromatographie, Arbeitsmethodik*, Firmenschrift der Firma Schleicher & Schüll, Kreis Einbeck, 3. Auflage, 1955, Seite 54.
- (16) O. N. Witt und Kaufmann, *Ber. dtsh. chem. Ges.* 24, 3157 (1891).
- (17) P. Friedländer und Reinhardt, *Ber. dtsh. chem. Ges.* 27, 238 (1894).
- (18) E. Bamann, K. Schriever und E. Link, *Arch. Pharmaz. Ber. dtsh. pharmaz. Ges.* 287/59, 91, 133 (1954).
- (19) *Topley's and Wilson's principles of Bacteriology and Immunity*, by G. G. Wilson and A. A. Miler, Edward Arnold Publishers, Ltd. London, 4. Edition, 1957, Chapter 31, page 857ff.

*) Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für eine Sachbeihilfe.

Anschrift: Prof. Dr. J. Eisenbrand, Saarbrücken 3, Großherzog-Friedrich-Str. 134.