

# Untersuchungen mit $^{14}\text{C}$ -markiertem Pyrokohlensäurediäthylester

## IV. Mitteilung.

### Reaktionen mit DL-Äpfelsäure

R. SCHELENZ und E. FISCHER

Mitteilung aus dem Institut für Strahlentechnologie der Bundesforschungsanstalt für Lebensmittelrisikohaltung, Karlsruhe (BRD)\*

Eingegangen am 2. August 1971

## Investigations with $^{14}\text{C}$ -Labelled Pyrocarbonicacid Diethylester

### IV. Reactions with DL-Malic Acid

*Summary.* The reaction of DL-malic acid with pyrocarbonicacid diethylester (PCE) in aqueous solution yielded all seven theoretically possible carbethoxylated and esterificated derivatives. By application of reference substances and PCE differently labelled with  $^{14}\text{C}$ , it was possible to identify the derivatives of malic acid chromatographically and to determine their amounts in the reaction mixture quantitatively. At pH 3.6 about 73% of the amounts of residues consisted of DL-malic acid-1-monoethylester. By changing the pH from 3.6 to 1.6 the amount of the total reaction products increased by the factor of ten and the percentages of the individual reaction products were largely changed.

*Zusammenfassung.* Bei der Reaktion von DL-Äpfelsäure mit Pyrokohlensäurediäthylester (PKE) in wäßriger Lösung entstanden alle sieben theoretisch möglichen carbäthoxylierten und veresterten Derivate. Durch den Einsatz von Vergleichssubstanzen und von jeweils unterschiedlich mit  $^{14}\text{C}$  markiertem PKE war es möglich, die einzelnen Äpfelsäurederivate chromatographisch zu identifizieren und ihre Anteile im Reaktionsgemisch quantitativ zu bestimmen. Die Rückstandsmenge bestand beim pH-Wert 3,6 zu ca. 73% aus DL-Äpfelsäure-1-monoäthylester. Die Menge der Gesamtreaktionsprodukte erhöhte sich bei Änderung des pH-Wertes von 3,6 auf 1,6 um eine Größenordnung; die prozentualen Anteile der einzelnen Reaktionsprodukte an der Gesamtreaktionsmischung veränderten sich dabei erheblich.

### Einleitung

In den vorangegangenen Mitteilungen [1–3] wurden Einflüsse der Art und Zusammensetzung von Hydrolysemedien auf die Bildung von Nebenprodukten nach einer Reaktion mit Pyrokohlensäurediäthylester (PKE) beschrieben. Zur Beurteilung der Verwendbarkeit von PKE zur Kaltentkeimung sind jedoch nicht nur die Mengen der in Lebensmitteln nach einer PKE-Behandlung gebildeten Reaktionsprodukte, sondern auch deren chemische Natur und die daraus resultierenden physiologischen Aspekte von Interesse.

Obwohl bekannt ist, daß es sich bei den Reaktionen von Lebensmittelinhaltsstoffen mit PKE im wesentlichen um Carbäthoxylierungen und Veresterungen handelt, sind nur N-Carbäthoxyverbindungen von Aminosäuren, Peptiden und Proteinen sowie O-Carbäthoxyderivate von Pflanzenphenolen und Hydroxysäuren eingehender studiert worden [4–11]. Untersuchungen zur Veresterung von Fruchtsäuren in wäßrigen Medien durch PKE sind kaum bekannt. So konnte beispielsweise stärkere Esterbildung in Wein durch PKE unter praxisnahen Bedingungen nicht beobachtet werden [12], obwohl schon früher auf eine derartige Möglichkeit hingewiesen worden war [13]. Nach Zugabe von 20 g PKE zu 1 g Isovaleriansäure beim pH-Wert 2.8–3.0 wurden lediglich 0.05 mg Isovaleriansäureäthylester gaschromatographisch nachgewiesen [14]. Für 30%ige wäßrige DL-Äpfelsäurelösung wurde jedoch von uns gezeigt, daß beim pH-Wert 3,6 die Veresterung durch PKE siebenmal größer ist als die Carbäthoxylierung [3]<sub>4</sub>.

Es lag daher nahe, am Modell der DL-Äpfelsäure als Verbindung mit drei H-aciden Gruppen die Menge der mit PKE entstehenden Reaktionsprodukte auch in Abhängigkeit vom pH-Wert genauer zu untersuchen und die entstehenden Verbindungen

\* Unser besonderer Dank gilt Fr. R. Eysler und Herrn R. Lemanczyk für die sorgfältige Versuchsdurchführung.

zu identifizieren. Da mit einer geringen Bildungsrate gerechnet werden mußte, war nicht zu erwarten, daß mit klassischen Analyseverfahren alle gebildeten DL-Äpfelsäurederivate quantitativ erfaßt und identifiziert werden konnten. Daher sollte die Radioindikatorteknik als besonders empfindliche Methode eingesetzt werden. Um mit dieser Methode zwischen Estern und O-Carbäthoxyverbindungen der DL-Äpfelsäure unterscheiden zu können, wurden zwei mit  $^{14}\text{C}$  unterschiedlich markierte PKE verwendet:  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}^{14}\text{COOCOCH}_2\text{CH}_3$  und  $\text{CH}_3^{14}\text{CH}_2\text{OCOOCOCH}_2\text{CH}_3$ . Mit PKE-(Carbonyl- $^{14}\text{C}$ ) können bei der Reaktion mit DL-Äpfelsäure lediglich  $^{14}\text{C}$ -markierte Carbäthoxyverbindungen und  $^{14}\text{C}$ -Kohlendioxid entstehen, mit PKE-(Äthyl-1- $^{14}\text{C}$ ) jedoch  $^{14}\text{C}$ -markierte Ester und Carbäthoxyverbindungen sowie  $^{14}\text{C}$ -Äthylalkohol. Der Anteil der Veresterungen kann nach Entfernen des  $^{14}\text{CO}_2$  in einem Fall und von  $^{14}\text{C}$ -Äthylalkohol im anderen Fall in gleichartigen Versuchen aus der Differenz der ermittelten  $^{14}\text{C}$ -Aktivitäten der Lösungen bestimmt werden [3]. Zur Identifizierung und quantitativen Bestimmung auch noch sehr geringer Mengen an Umsetzungsprodukten sollte die Radiopapierchromatographie in Verbindung mit der Flüssigkeitsszintillationsspektrometrie eingesetzt werden. Durch diese spezielle Versuchstechnik war eine Störung durch sehr geringe Mengen von ebenfalls vorhandenem  $^{14}\text{C}$ -Diäthylcarbonat nicht zu erwarten.

### Beschreibung der Versuche

Es wurden zwei mit  $^{14}\text{C}$  unterschiedlich markierte PKE-Präparate hergestellt [15]. Die Untersuchungen wurden überwiegend mit einer spez. Aktivität von  $4,6 \mu\text{Ci/g}$  ( $0,75 \mu\text{Ci/mMol}$ ) beim PKE-(Carbonyl- $^{14}\text{C}$ ) und von  $5,7 \mu\text{Ci/g}$  ( $0,92 \mu\text{Ci/mMol}$ ) beim PKE-(Äthyl-1- $^{14}\text{C}$ ) durchgeführt.

Jeweils 5 ml 30%ige wäßrige DL-Äpfelsäurelösung — soweit erforderlich — mit 2 n NaOH auf den gewünschten pH-Wert einstellen und gleiche Gewichtsanteile  $^{14}\text{C}$ -PKE (bezogen auf eingesetzte DL-Äpfelsäure) unter Rühren in einen 10-ml-Erlenmeyerkolben mit Rückflußkühler geben. Nach beendeter Reaktion im Falle des PKE-(Carbonyl- $^{14}\text{C}$ ) Stickstoff zur Entfernung des gebildeten  $^{14}\text{CO}_2$  unter Rühren über die Lösungsoberfläche leiten. Bei der Umsetzung mit PKE-(Äthyl-1- $^{14}\text{C}$ ) entstandenen  $^{14}\text{C}$ -Äthylalkohol bei Unterdruck aus der Lösung absaugen [3].

Bei der Umsetzung von  $^{14}\text{C}$ -markiertem PKE mit den von uns zur Identifizierung der Reaktionsprodukte hergestellten DL-Äpfelsäurederivaten in gleicher Weise verfahren. Umsetzungen bei Raumtemperatur durchführen. Die in Tab. 1 angegebenen Zahlenwerte der in den Reaktionslösungen gefundenen  $^{14}\text{C}$ -Einzelaktivitäten sind Mittelwerte aus Doppelbestimmungen von mindestens zwei Parallelversuchen.

Lokalisierung und Trennung der Umsetzungsprodukte in den Lösungen mit Hilfe absteigender Papierchromatographie im Lösungsmittelsystem 2-Methylbutanol-1/Eisessig/Wasser (4 + 1 + 1), auf S+S-Papier 2043 b Mgl [2]. Säuren durch Besprühen mit einer Bromkresolgrün-Lösung als gelbe Flecke sichtbar machen. Ester auf den Chromatogrammen mit einer frisch hergestellten Mischung aus wäßriger Hydroxylaminhydrochlorid-Lösung und methanolischer KOH zu den Kaliumhydroxamaten umsetzen. Beim Besprühen mit wäßriger  $\text{FeCl}_3$ -Lösung erscheinen die Ester als rostrote Flecke.

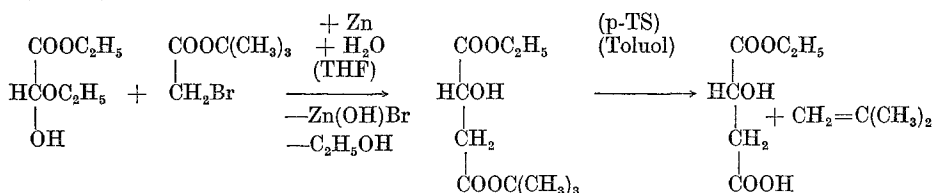
Die  $^{14}\text{C}$ -Aktivitätsverteilung auf den Chromatogrammen mit einem Radiochromatographen (Tracerlab-4  $\pi$ -Scanner) ermitteln. Prozentuale Verteilung der Radioaktivität auf die einzelnen Substanzen zusätzlich durch empfindlichere Auswertung der zerschnittenen Chromatogramme mit Hilfe der Flüssigkeitsszintillationsspektrometrie (Beckmann CPM 200) in einem Dioxan-Szintillatormischbestimmen [2]. Aktivitätswerte im Peak mit weniger als 1% der Gesamtaktivität wurden vernachlässigt. Die vom Startfleck bis zur Lösungsmittelfront gemessene  $^{14}\text{C}$ -Gesamtaktivität wurde gleich 100% gesetzt.

### Herstellung der DL-Äpfelsäurederivate

1. DL-Äpfelsäurediäthylester. Diester durch säurekatalysierte Veresterung (konz.  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) von DL-Äpfelsäure in einem Überschuß von abs. Äthylalkohol unter Rühren durch Kochen am Rückfluß (24 Std) erhalten. Nach Aufarbeitung und Rektifikation wurde ein chromatographisch reiner Diester vom  $K_p$  108—110° C mit einem  $R_f$ -Wert 0,83 gewonnen.

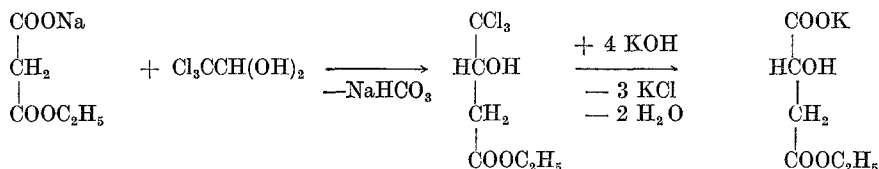
2. DL-Äpfelsäuremonoäthylester. Die in der Literatur beschriebene partielle Verseifung von Malonsäurediäthylester mit äthanolischer KOH [16] führte beim DL-Äpfelsäurediäthylester zu einem Gemisch von DL-Äpfelsäure-1- und -4-monoäthylester. Da die Anwendung traecertechnischer Methoden besonders reine Substanzen erfordert, war eine gezielte Synthese der beiden DL-Äpfelsäuremonoäthylester erforderlich.

## a) DL-Äpfelsäure-1-monoäthylester



Glyoxylsäureäthylester-äthylhalbacetal [15] mit Bromessigsäure-tert.-butylester und Zn-Pulver in Tetrahydrofuran im Sinne einer Reformatzky-Synthese zum gemischten Äthyl-tert.-butylester der DL-Äpfelsäure umsetzen. Der hydrolyseempfindliche Bromessigsäure-tert.-butylester wurde durch Umsetzung von Bromessigsäure mit Thionylchlorid unter gelindem Erwärmen zum Bromessigsäurechlorid und dessen anschließender Umsetzung mit tert.-Butanol in einer Mischung aus abs. Diäthyläther und trockenem Pyridin erhalten. Nach Abspaltung der tert.-Butylgruppierung mit p-Toluolsulfonsäure in Toluol [16] den 1-Monoester isolieren;  $Kp_{2-4}$  110–112° C;  $R_f$ -Wert 0,71.

b) DL-Äpfelsäure-4-monoäthylester: Der 4-Monoäthylester kann analog dem 1-Monoäthylester durch Reformatzky-Synthese aus Glyoxylsäure-tert.-butylester-tert.-butylhalbacetal und Bromessigsäureäthylester in ausreichender Reinheit erhalten werden. Einfacher ist es jedoch, den DL-Äpfelsäure-4-monoäthylester auf folgendem Wege zu synthetisieren:



Malonsäuremonoäthylester und Chloralhydrat in Wasser mit  $\text{NaHCO}_3$  auf pH-Wert 7 einstellen. Den bei der Umsetzung entstandenen 4,4,4-Trichloro-3-hydroxy-buttersäureäthylester [17, 18] anschließend mit äthanolischer KOH zum 4-Monoäthylester verseifen.  $Kp_{2-4}$  90–93° C;  $R_f$ -Wert 0,65.

## Ergebnisse

Unter den gewählten Reaktionsbedingungen, sowie aufgrund der bekannten chemischen Eigenschaften von DL-Äpfelsäure und auch von PKE, sind nach einer Umsetzung beider Substanzen miteinander in wäßrigem Medium sieben monomere Reaktionsprodukte zu erwarten (Abb. 1). Führt man die Umsetzung mit PKE-(Carbonyl- $^{14}\text{C}$ ) durch, so können nur die carbäthoxylierten Verbindungen I–IV (linke Hälfte Abb. 1) radioaktiv markiert sein. Nach einem Umsatz mit PKE-(Äthyl- $^{14}\text{C}$ ) müssen die Ester V–VII (rechte Hälfte Abb. 1) und die Carbäthoxyverbindungen über Radioaktivitätsmessungen nachzuweisen sein. Besonders wegen der chemischen Labilität der Carbäthoxyverbindungen war zur Trennung und Identifizierung der entstandenen Reaktionsprodukte die Radiochromatographie anderen Methoden überlegen. Nach der Umsetzung von 30%iger wäßriger DL-Äpfelsäurelösung beim pH-Wert 3,6 mit dem gleichen Gewichtsanteil PKE-(Äthyl- $^{14}\text{C}$ ) konnten nach der papierchromatographischen Auftrennung der Reaktionslösung neben inaktiver DL-Äpfelsäure ( $R_f$ -Wert 0,39) acht weitere Substanzen mit folgenden  $R_f$ -Werten aufgrund ihrer Radioaktivität lokalisiert werden: 0,03; 0,56; 0,65; 0,71; 0,73; 0,79; 0,83 und 0,87. Durch Vergleich der  $R_f$ -Werte der von uns hergestellten Äpfelsäurederivate mit denjenigen in der aufgetrennten Reaktionslösung, konnten drei Verbindungen zugeordnet werden (s. auch Abb. 1):

$R_f$ -Wert	Reaktionsprodukt
0,65	DL-Äpfelsäure-4-monoäthylester (VII)
0,71	DL-Äpfelsäure-1-monoäthylester (V)
0,83	DL-Äpfelsäurediäthylester (VI)

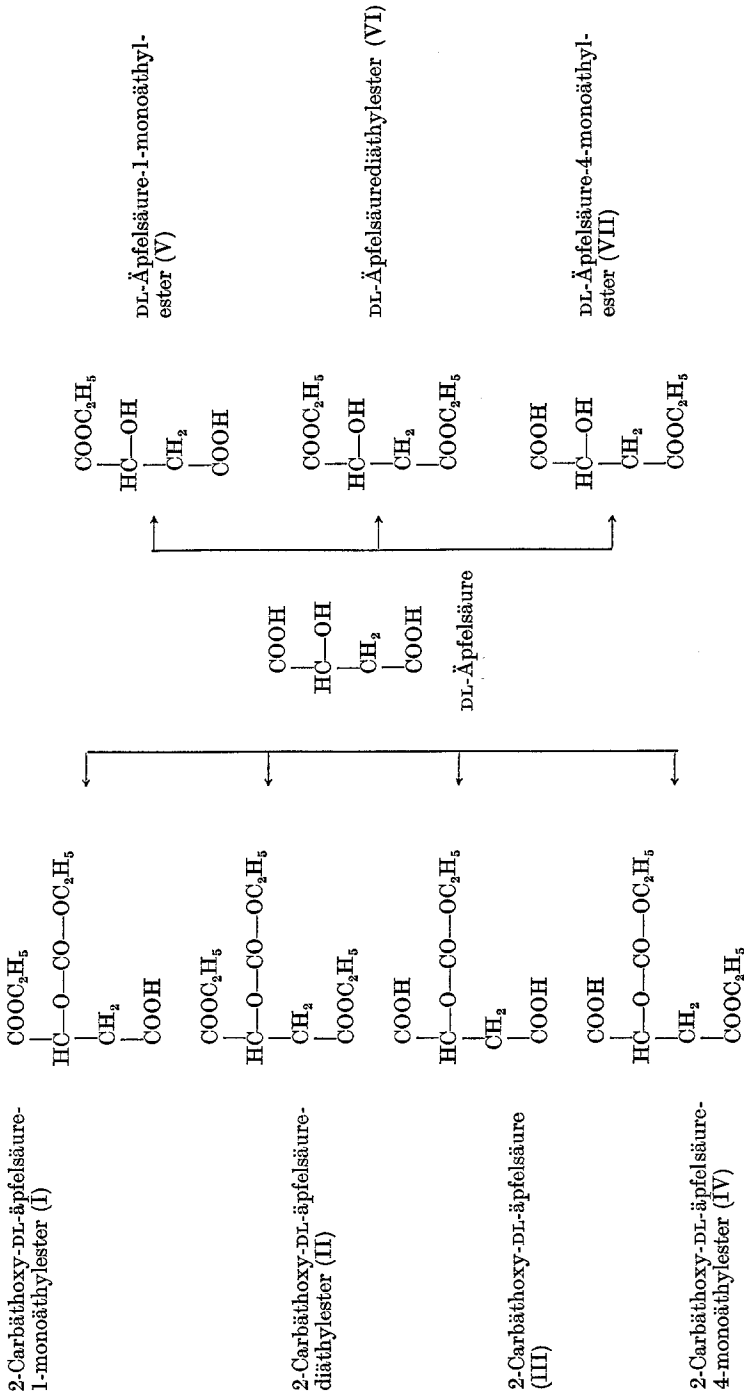


Abb. 1. Reaktionsprodukte nach Umsatz von DL-Äpfelsäure mit PKE beim pH-Wert 3,6 und Raumtemperatur

Zur weiteren Aufklärung der bei der Umsetzung entstandenen Reaktionsprodukte wurden die Vergleichssubstanzen V, VI und VII einzeln mit PKE-(Carbonyl- $^{14}\text{C}$ ) unter den beschriebenen Reaktionsbedingungen umgesetzt (Abb. 2). Aufgrund der Strukturformel des Diesters (VI) ist der Angriff des PKE lediglich an der freien OH-Gruppe unter Carbäthoxylierung möglich und führt zum 2-Carbäthoxy-DL-äpfelsäurediäthylester (II). Bei der Reaktion von VI mit PKE-(Carbonyl- $^{14}\text{C}$ ) wurde auch nur eine radioaktive Substanz mit dem  $R_f$ -Wert 0,87 erhalten. Bei der Umsetzung von DL-Äpfelsäure-1-monoäthylester (V) mit PKE-(Carbonyl- $^{14}\text{C}$ ) wurden drei

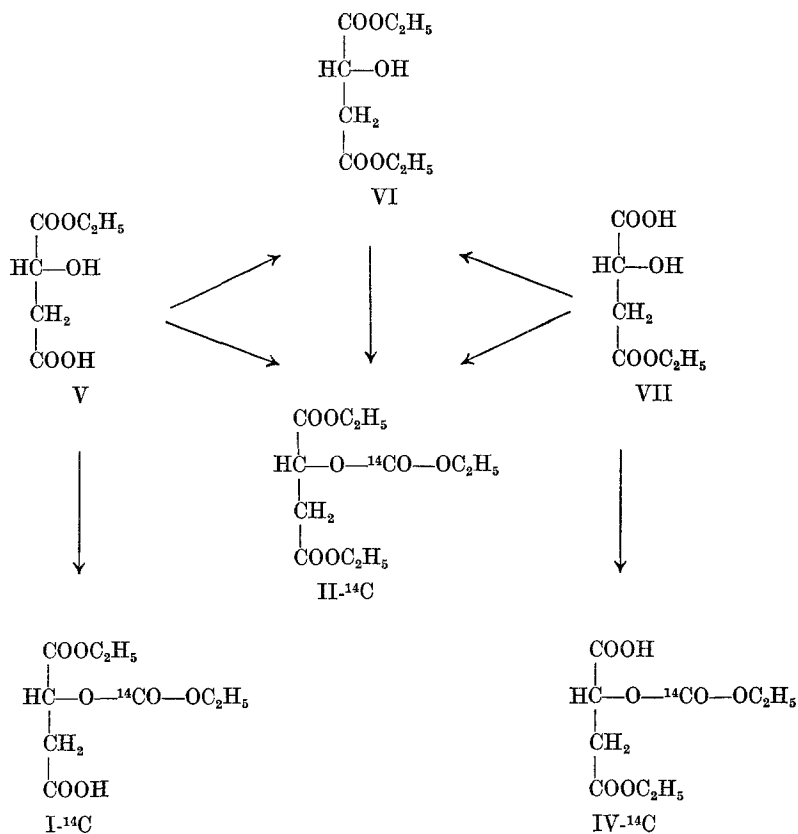


Abb. 2. Nachgewiesene Reaktionsprodukte nach Umsatz der Verbindungen V—VII mit PKE-(Carbonyl- $^{14}\text{C}$ ) in wäßriger Lösung bei Raumtemperatur

Substanzen — zwei radioaktive mit den  $R_f$ -Werten 0,79 und 0,87, sowie eine nicht-aktive mit dem  $R_f$ -Wert 0,83 — gefunden. Bei den Verbindungen mit den  $R_f$ -Werten 0,83 und 0,87 handelt es sich — wie bereits gezeigt — um die Substanzen VI und II. Die Tatsache, daß auch die nicht radioaktive Verbindung VI gefunden wird, beweist die Esterbildung durch PKE. Die Verbindung mit dem  $R_f$ -Wert 0,79 kann danach nur noch 2-Carbäthoxy-DL-äpfelsäure-1-monoäthylester (I) sein, da der Angriff des PKE auf die OH-Gruppe in 2-Stellung des 1-Monoesters als einzige Reaktionsmöglichkeit verbleibt (Abb. 2).

Die analoge Umsetzung des DL-Äpfelsäure-4-monoäthylesters (VII) mit PKE-(Carbonyl- $^{14}\text{C}$ ) lieferte nach der chromatographischen Auftrennung ebenfalls drei Reaktionsprodukte mit den  $R_f$ -Werten 0,73, 0,83 und 0,87, von denen zwei radioaktiv waren. Wie schon beim 1-Monoester wurden wieder die Verbindungen VI und II

gebildet. Die radioaktive Substanz mit dem  $R_f$ -Wert 0,73 wurde dem 2-Carbäthoxy-DL-Äpfelsäure-4-monoäthylester (IV) zugeordnet.

Beim Umsatz der 1- und 4-Monoester der DL-Äpfelsäure mit PKE-(Äthyl-1- $^{14}\text{C}$ ) wurden unter den gleichen Versuchsbedingungen jeweils drei radioaktive Verbindungen mit den bereits beschriebenen  $R_f$ -Werten erhalten.

Aufgrund der noch verbliebenen Reaktionsmöglichkeiten von PKE mit DL-Äpfelsäure (Abb. 1) kann die Verbindung mit dem  $R_f$ -Wert 0,56 nur noch der 2-Carbäthoxy-DL-Äpfelsäure (III) entsprechen. Auf dem Chromatogramm wurde für diese Substanz nur eine Säure- und keine Esterreaktion festgestellt.

Die gemessene  $^{14}\text{C}$ -Aktivität beim  $R_f$ -Wert 0,03 ist hauptsächlich carbäthoxylierten Na-Salzen der DL-Äpfelsäure zuzuschreiben. Höherkondensierte carbäthoxylierte und veresterte DL-Äpfelsäurederivate sowie deren Na-Salze können jedoch ebenfalls vorhanden sein [19]. Die Bildung von Fumar- oder Maleinsäure sowie deren Ester durch Wasserabspaltung aus DL-Äpfelsäure [20] wurde bei den gewählten Versuchsbedingungen durch chromatographischen Vergleich ausgeschlossen.

Tabelle 1. Prozentuale  $^{14}\text{C}$ -Aktivitätsverteilung nach der Reaktion von 30% iger wäßriger DL-Äpfelsäurelösung mit PKE-(Carbonyl- $^{14}\text{C}$ ) und PKE-(Äthyl-1- $^{14}\text{C}$ ) bei den pH-Werten 1,6 und 3,6 (ca. 22° C). RA =  $^{14}\text{C}$ -Aktivitätsanteile der Umsetzungsprodukte bezogen auf die  $^{14}\text{C}$ -Restaktivität bei Reaktionsende, CA =  $^{14}\text{C}$ -Aktivitätsanteile der Umsetzungsprodukte bezogen auf die  $^{14}\text{C}$ -Gesamtaktivität des Chromatogramms

Umsetzungsprodukte	$R_f$ - Werte	PKE-(Äthyl-1- $^{14}\text{C}$ ) pH 3,6		PKE-(Carbonyl- $^{14}\text{C}$ ) pH 3,6		pH 1,6	
		CA %	RA %	CA %	RA %	CA %	RA %
Startfleck	0	—	—	—	—	2,9	0,14
Na-Salze der DL-Äpfelsäure	0,03	5,6	0,21	35,9	0,17	—	—
2-Carbäthoxy-DL-Äpfelsäure (III)	0,56	1,7	0,07	15,5	0,07	68,6	3,33
DL-Äpfelsäure-4- monoäthylester (VII)	0,65	3,4	0,13	—	—	—	—
DL-Äpfelsäure-1- monoäthylester (V)	0,71	72,8	2,84	—	—	—	—
2-Carbäthoxy-DL-Äpfelsäure- 4-monoäthylester (IV)	0,73	7,7	0,30	31,3	0,15	17,4	0,84
2-Carbäthoxy-DL-Äpfelsäure- 1-monoäthylester (I)	0,79	2,4	0,09	—	—	—	—
DL-Äpfelsäurediäthylester (VI)	0,83	1,5	0,06	—	—	—	—
2-Carbäthoxy-DL-Äpfelsäure- diäthylester (II)	0,87	2,9	0,11	13,1	0,06	3,7	0,18
Summe der Einzelaktivitäten		98,0	3,81	95,8	0,45	92,6	4,49

Menge und Art der gebildeten Reaktionsprodukte nach der Umsetzung von PKE-(Carbonyl- $^{14}\text{C}$ ) mit wäßriger DL-Äpfelsäurelösung bei zwei pH-Werten gehen aus Tab. 1 hervor. Beim pH-Wert 3,6 sind die Hauptreaktionsprodukte mit je rund  $\frac{1}{3}$  der  $^{14}\text{C}$ -Gesamtaktivität des Chromatogramms (CA-Wert) die Natriumsalze carbäthoxylierter DL-Äpfelsäurederivate sowie carbäthoxylierter 4-Monoester (IV). Als carbäthoxylierte Substanz sollte die Verbindung I bei der Umsetzung von DL-Äpfelsäure mit PKE-(Carbonyl- $^{14}\text{C}$ ) ebenfalls entstehen. Sie wurde zwar bei beiden pH-Werten auch nachgewiesen, ist jedoch in Tab. 1 nicht aufgeführt worden, da wegen der zu geringen gemessenen Aktivität eine quantitative Auswertung nicht möglich war.

Bei der Umsetzung von DL-Äpfelsäure mit PKE-(Äthyl-1- $^{14}\text{C}$ ) wurde als Hauptreaktionsprodukt beim pH-Wert 3,6 DL-Äpfelsäure-1-monoäthylester (V) mit nahezu 73% der  $^{14}\text{C}$ -Gesamtaktivität gefunden. Die anderen sieben Reaktionsprodukte treten mit insgesamt 27% der  $^{14}\text{C}$ -Gesamtaktivität deutlich in den Hintergrund.

In der III. Mitteilung [3] war bereits festgestellt worden, daß beim pH-Wert 3,6 die  $^{14}\text{C}$ -Gesamtrestaktivität nach der Umsetzung von 30% iger wäßriger DL-Äpfelsäurelösung mit PKE-(Äthyl- $^{14}\text{C}$ ) 3,90% und mit PKE-(Carbonyl- $^{14}\text{C}$ ) 0,48% beträgt. Bezieht man diese Werte auf die Gesamtradioaktivität der vergleichbaren Chromatogramme, die auf 100% festgelegt wurde, dann ergeben sich nach Tab. 1 für die Einzelsubstanzen die ihrem prozentualen Aktivitätsanteil auf dem Chromatogramm entsprechenden prozentualen Restaktivitätsanteile in der Reaktionslösung (RA-Werte). Aus diesen RA-Werten lassen sich dann durch Multiplikation mit dem Faktor 2 die tatsächlich in der Reaktionslösung vorliegenden prozentualen Mengen jeder Einzelsubstanz ermitteln (Tab. 2). In dieser Tab. 2, die lediglich die Verhältnisse bei der Reaktion mit PKE-(Äthyl- $^{14}\text{C}$ ) wiedergibt, sind die in der Summe der Einzelaktivitäten noch fehlenden 2% (für die CA-Werte), bzw. 0,09% (für die RA-Werte) als „übrige  $^{14}\text{C}$ -markierte Produkte“ aufgeführt.

Tabelle 2. *Prozentuale Rückstandsmengen nach der Reaktion von DL-Äpfelsäure mit PKE beim pH-Wert 3,6 und Raumtemperatur*

Substanz	Rückstandsmenge (auf 100% eingesetzten PKE bezogen) %
Carbäthoxylierte oder veresterte Na-Salze der DL-Äpfelsäure	0,42
2-Carbäthoxy-DL-äpfelsäure (III)	0,14
DL-Äpfelsäure-4-monoäthylester (VII)	0,26
DL-Äpfelsäure-1-monoäthylester (V)	5,68
2-Carbäthoxy-DL-äpfelsäure-4-monoäthylester (IV)	0,60
2-Carbäthoxy-DL-äpfelsäure-1-monoäthylester (I)	0,18
DL-Äpfelsäurediäthylester (VI)	0,12
2-Carbäthoxy-DL-äpfelsäurediäthylester (II)	0,22
Übrige $^{14}\text{C}$ -markierte Produkte	0,18
Gesamtrückstandsmenge	7,80

Aus der Theorie über die Verteilung der  $^{14}\text{C}$ -Atome in den beschriebenen Reaktionsprodukten muß bei ausschließlich carbäthoxylierten Derivaten die  $^{14}\text{C}$ -Restaktivität nach der Umsetzung mit den unterschiedlich markierten PKE-Präparaten gleich sein, wenn die sonstigen Reaktionsbedingungen gleich sind. Für 2-Carbäthoxy-DL-äpfelsäure (III) wurden auch in beiden Fällen RA-Werte von 0,07% ermittelt. Dies kann auch als weiterer Beweis angesehen werden, daß diese Verbindung keine Estergruppierung enthält. Reaktionsprodukte, die sowohl eine Ester- als auch eine Carbäthoxygruppe im Molekül enthalten, müssen gegenüber der Umsetzung mit PKE-(Carbonyl- $^{14}\text{C}$ ) bei der Reaktion von DL-Äpfelsäure mit PKE-(Äthyl- $^{14}\text{C}$ ) um den Faktor 2 höhere RA-Werte aufweisen. Diese Überlegungen wurden auch bei den Verbindungen II und IV bestätigt (Tab. 1).

Die Wahrscheinlichkeit, daß in der Verbindung II (2-Carbäthoxy-DL-äpfelsäurediäthylester) beide Äthylgruppen gleichzeitig radioaktiv markiert werden, ist proportional dem Quadrat der Konzentration der  $^{14}\text{C}$ -Atome im PKE und daher sehr gering. Wenn beispielsweise jedes 100. Kohlenstoffatom radioaktiv ist, dann kommen auf  $10^4$  an einer Äthylgruppe markierte Moleküle nur ein an beiden Äthylgruppen markiertes Molekül. Das Verhältnis 1:2 der RA-Werte bleibt also bei beiden Reaktionen gewahrt.

Nach diesen Überlegungen sollte für die Substanz I der RA-Wert nach der Umsetzung mit PKE-(Carbonyl- $^{14}\text{C}$ ) etwa 0,045% sein. Höhere spez. Aktivitäten des PKE-(Carbonyl- $^{14}\text{C}$ ) wären erforderlich gewesen, um diesen Wert noch quantitativ erfassen zu können.

Für die Reaktion der DL-Äpfelsäure mit PKE-(Carbonyl- $^{14}\text{C}$ ) wurde beim pH-Wert 1,6 eine Restaktivität von 4,84% und damit eine Rückstandsmenge von 9,68% gefunden. Diese ist also um das Zehnfache größer als beim pH-Wert 3,6. Da bei diesem

pH-Wert keine  $\text{Na}^+$ -Ionen in der Reaktionslösung vorhanden waren, wurde diese Reaktion als Vergleichsmodell herangezogen. Als Hauptreaktionsprodukt wird mit rund  $\frac{2}{3}$  der  $^{14}\text{C}$ -Gesamtaktivität die Substanz III (2-Carbäthoxy-DL-Äpfelsäure) gebildet.

### Diskussion der Ergebnisse

Die hier vorgelegten Ergebnisse machen deutlich, daß sich nicht nur die Menge der Reaktionsprodukte von PKE mit DL-Äpfelsäure bei Änderung des pH-Wertes von 3,6 auf 1,6 um eine Größenordnung erhöht. Es verschieben sich außerdem die prozentualen Anteile der einzelnen Reaktionsprodukte an der Gesamtrückstandsmenge ganz erheblich. Wenn schon bei der DL-Äpfelsäure mindestens 7 Derivate gebildet werden können, dann ist z. B. für ein Fruchtsaftgetränk nach einer PKE-Behandlung kaum vorherzusagen, welche Inhaltsstoffe mit PKE bevorzugt reagieren und mit welchem Anteil sie an der Gesamtrückstandsmenge beteiligt sind. Wegen der möglichen organoleptischen Beeinflussung PKE-behandelter Getränke erscheint uns der hohe Anteil veresterter Reaktionsprodukte der DL-Äpfelsäure von besonderem Interesse.

Da nach unseren früheren Untersuchungen [3] in einem weiten Bereich eine lineare Abhängigkeit der Gesamtrückstandsmenge sowohl von der Äpfelsäurekonzentration als auch von der PKE-Konzentration besteht, können zumindest für Äpfelsäurekonzentrationen bis zu 30% die bestimmten Konzentrationen entsprechenden Gesamtrückstandsmengen beim pH-Wert 3,6 errechnet werden. So beträgt z. B. die Rückstandsmenge nach Reaktion von 5%iger wäßriger DL-Äpfelsäurelösung mit 0,1% PKE 13 mg/kg DL-Äpfelsäurelösung. Davon entfallen 1,6 mg/kg auf carbäthoxylierte und 11,4 mg/kg auf veresterte DL-Äpfelsäurederivate. Grundlage für diese Berechnung ist der Wert von 1,3% für die Gesamtrückstandsmenge in einer 5%igen Äpfelsäurelösung, d. h.  $\frac{1}{6}$  des Wertes von 7,80% für eine 30%ige Äpfelsäurelösung.

Verständlicherweise läßt sich diese Rechenmethode dann nicht anwenden, wenn die Äpfelsäure z. B. in einem Getränk noch von zahlreichen weiteren Bestandteilen des Lebensmittels begleitet ist.

Unsere in dieser und den vorangegangenen Mitteilungen beschriebenen Untersuchungen über die beim pH-Wert 3,6 ablaufenden Reaktionen des PKE mit Bestandteilen von Lebensmitteln hatten jedoch vor allem zum Ziel, die Kenntnisse über die in einem ausgewählten Modell-Lebensmittel mit PKE stattfindenden chemischen Umsetzungen zu erweitern. Wir haben Apfelmark mit einem pH-Wert 3,6 als Modell für solche Untersuchungen eingesetzt. Über die Ergebnisse dieser Arbeiten soll in der folgenden Mitteilung berichtet werden.

### Literatur

1. Fischer, E.: Diese Z. **142**, 31 (1970).
2. Fischer, E.: Diese Z. **144**, 262 (1970).
3. Schelenz, R., Fischer, E.: Diese Z. **145**, 279 (1971).
4. Duhm, B., Maul, W., Medenwald, H., Patzschke, K., Wegner, L. A.: Diese Z. **132**, 200 (1966).
5. Paulus, W., Lorke, D.: Diese Z. **132**, 325 (1967).
6. Lang, K., Fingerhut, M., Krug, E., Reimold, W.: Diese Z. **132**, 333 (1967).
7. Lang, K., Fingerhut, M., Krug, E., Reimold, W.: Z. Ernährungswiss. **6**, 219 (1966).
8. Rauenbusch, E.: Z. Ernährungswiss. **9**, 1 (1968).
9. Paulus, W.: Z. Ernährungswiss. **9**, 11 (1968).
10. Rosen, C.-G., Fedoresak, I.: Biochim. Biophys. Acta **130**, 401 (1966).
11. Mühlrad, A., Hegyi, G., Toth, G.: Acta Biochem. Biophys. **22**, 19 (1967).
12. Hennig, K.: Weinberg Keller **9**, 271 (1962).
13. Koch, J.: Weinberg Keller **9**, 18 (1962).
14. Pauli, O., Genth, H.: Diese Z. **132**, 216 (1966).
15. Fischer, E., Schelenz, R.: J. Label. Compounds **5**, 333 (1969).
16. Breslow, D. S., Baumgarten, E., Hauser, C. R.: J. Am. Chem. Soc. **66**, 1286 (1944).
17. Couturier, P.: Bull. Soc. Chim. France **17**, 25 (1950).



18. Caujolle, F., Couturier, P., Doumerc, M.: Bull. Soc. Chim. France 17, 22 (1950).  
 19. Thoma, W., Rinke, H.: Liebigs Ann. Chem. 624, 30 (1959).  
 20. Fieser, L. F., Fieser, M.: Organische Chemie, S. 105. Weinheim/Bergstr.: Verlag Chemie 1965.

Dipl.-Chem. R. Schelenz  
 Institut für Strahlentechnologie der  
 Bundesforschungsanstalt für Lebensmittel-  
 frischhaltung  
 D-7500 Karlsruhe 1  
 Engesserstraße 20

## Oxime mit Süßstoffeigenschaften\*

### IX. Mitteilung: Über ungesättigte Oxime [1]

B. UNTERHALT und L. BÖSCHEMEYER

Mitteilung aus dem Institut für Pharmazeutische Chemie und Lebensmittelchemie der Universität Marburg/Lahn (BRD)\*\*

Eingegangen am 16. Juli 1971

#### Oximes as Artificial Sweeteners

*Summary.* Contrary to the literature sweet anisaloxime and perillartine possess the (E)-configurations. Searching for substances of similar structure we found the sweet 1-Cyclopentene-aldoxime VIII and 1-Cyclohexene-aldoxime IX.

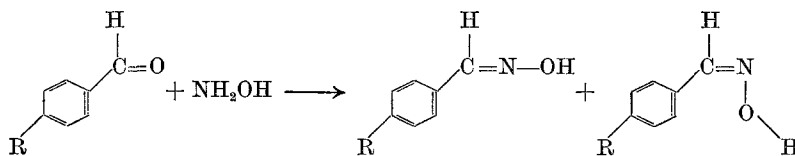
*Zusammenfassung.* Im Gegensatz zu Literaturangaben ist dem süß schmeckenden Anisaldoxim und dem Perilla-aldoxim die (E)-Konfiguration zuzuordnen. Die Suche nach Verbindungen ähnlicher Struktur führte zum 1-Cyclopenten-aldoxim VIII und zum 1-Cyclohexen-aldoxim IX.

#### Einleitung

Kürzlich untersuchten Shallenberger u. Acree [2] den Zusammenhang zwischen Molekülstruktur und süßem Geschmack, wonach in vielen organischen Molekülen eine Grundeinheit aufzufinden ist, die für dieses Verhalten verantwortlich gemacht werden könnte: nämlich ein AH-B-System, in dem H ein acider Wasserstoff und B ein elektronegatives Zentrum ist. Der Abstand beider liegt bei etwa 3 Å.

#### Eigene Versuche

Während die obige Hypothese bei vielen Molekülen, wie z. B. bei Zuckern, Aminosäuren und beim Saccharin sowie Cyclamat, zutrifft, ist sie beim ebenfalls dort genannten Anisaldoxim I nicht haltbar [3]. Wir synthetisierten nämlich das Oxim-Gemisch, trennten es durch präparative Dünnschichtchromatographie (DC) in beide Isomere auf und unterzogen die DC einheitlichen Formen einer sensorischen Prüfung. Es ergab sich dabei, daß nicht das der obigen Theorie gehorchende (Z)-Aldoxim, sondern das (E)-Aldoxim süß schmeckt. Das gleiche Verhalten zeigt übrigens auch (E)-p-Methylbenzaloxim (II), das (E)-p-Isopropyl-Produkt (III) kann man hingegen nicht mehr als süß schmeckend bezeichnen.



I: R = OCH<sub>3</sub>  
 II: R = CH<sub>3</sub>  
 III: R = CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>

(E)

(Z)

\* Nach einem am 6. 2. 1971 in Frankfurt a. M. gehaltenen Vortrag.

\*\* Der Deutschen Forschungsgemeinschaft, Bad Godesberg, danken wir herzlich für die großzügige Unterstützung dieser Arbeiten.