注目すべき点は B 群 (加熱群) と A 群 (常温群) とでは平衡に達したときの効力が異なることで 10~50 日の間に両群の効力は殆んど変化を認めない。また P, メルク両製品とも放置すると同じ効力になる。

瞳孔に対する作用をみると加熱, 放置によつて効力低下はない。この点は Joachimoglu⁶⁾ の結果と一致する。また Oelkers 等は pH 4~5 の水溶液は安定であるというが, われわれの水溶液も蒸留水が酸性であるため溶かしたときすでに pH 5 を示している。従つて瞳孔作用については Oelkers と一致している。然し腸抑制作用が著しく変化している事実を如何に説明するかは今後の研究にまかたいと思う。

東京大学医学部薬学科

Summary

1) Change of activity in 0.05% aqueous solution of atropine sulfate with passage of time was examined by the anticholinergic action in excised intestine of guinea pigs and by mydriatic action in mice.

2) It was found with tests with excised intestine of guinea pigs that about 30% decrease in activity occurred on heating the solution at 80° for 1 hour. The activity also decreased rapidly in the first few days when heated and unheated solutions were kept at 20°, but both solutions showed a definite value after 10 days, and no further change were seen to have occurred after 60 days of storage. The activity of the heated preparation after this lapse of time decreased to 30~40%, and that of unheated preparation to 10~15%.

3) According to tests of mydriatic action in mice, the efficacy of the solution stored for 66 days was no different from that of the fresh solution.

(Received December 24, 1952)

96. 小川俊太郎：ビタミン C の螢光反応 (第5報*) 反応機序に就いて

Shuntaro Ogawa: Fluorescent Reaction of Vitamin C. V.
Mechanism of the Reaction.

(National Hygienic Laboratory**)

著者は第1報¹⁾に於いてアスコルビン酸 (AA) の第一階酸化成績体に当るデヒドロアスコルビン酸 (DAA) が弱酸性の水溶液中に於いて速かに *o*-phenylenediamine (OPD) と縮合して、紫藍色の螢光を發する物質を生ずる事実を報告するとともに、この反応の特異性に就き論じ、その際該反応の機序は 1934 年 Ohle²⁾ が DAA の C₅ 立体異性体 (*d* 系) に当るイソデヒドロアスコルビン酸 (iso-DAA) 及び OPD に就いて証明した反応 (Fig. 1) に準ずるものであらうことを予想した。

即ち Ohle²⁾ はイソアスコルビン酸 (iso-AA) は水溶液中でキノンにより定量的に酸化され iso-DAA となるが、この物質は OPD を加えて常温に放置するとき、もし iso-DAA と OPD とが等 mol あれば定量的に (I') を生じ、もし OPD が過剰であれば (II'') を副生するが、この際ある濃度の鉍酸が存在すれば (II'') の大部分が常温で次第に (III''') に変ずると述べている。然しながらこのとき Ohle は何ゆえか DAA (*l* 系) に関しては前記 (II') に対応する (II) を合成したに止まり、他の 2 物質に触れず、無論これ等物質の螢光の有無などに就ては何等言及しなかつた。

著者の反応も iso-DAA 系ではなく、DAA 系に就いて起るものであるが、すでに第1報¹⁾ 及び第3報³⁾ 中に

* 第4報, 小川: 本誌 73, 94 (1953).

** Tamagawa-Yoga-machi, Setagaya-ku, Tokyo.

1) 小川: 衛生試験 70, 72 (1952).

2) H. Ohle: Ber. 67, 555 (1934).

Fig. 1

述べたように本反応に関する限り DAA と iso-DAA とは定性的に全く同一の態度を示すのみならず、さらに第 2 報の装置によつて両者の発する螢光の強度が定量的にも全く一致する事実を知つたので、螢光反応の機構が前掲 Fig. 1 そのものであり、螢光物質の本態が同反応中に生ずる (I), (II) 又は (III) の何れかであることは殆んど誤りないものと見られるに至つた。しかし著者の場合反応がメタ燐酸及び酢酸の共存下に起り、DAA に比べて過剰の OPD が存在するために、螢光性物質が果して (I), (II) 及び (III) の中何れに該当するかは速かに予想し得なかつた。

そこで著者はまず前掲 Fig. 1 中の各物質を Ohle²⁾ に準じて合成するとともに、その諸性質を調べた結果、溶液の発する螢光の特徴、物質の R_f, 分光学的性質並びに誘導の体性質等に於いて定性反応液中の螢光物質と一致するものは (I) のみであることを立証し得た。

以上の事実により著者の見出したビタミン C の螢光反応は予想に違わず Fig. 1 に示す機構に従つて生起し、螢光の本態は OPD と DAA 各 1 mol の縮合により生じた (I) 即ち 2-(l-glycerodihydroxyethyl)-3-keto-furo[2,3-b]quinoxaline であると断定する。

終りに臨み、終始御懇篤なる御指導を賜つた 高木誠司先生に謹謝し、また種々の御配慮を賜つた本所所長 近藤 龍先生及び秋谷七郎先生に深く感謝する。なお有益なる御助言を賜つた佐橋佳一博士、実験に協力された平岡栄一、岡田太郎、南原精一の各氏、並びに元素分析を担当された神谷正造氏、東大農学部農芸化学科元素分析室諸氏に謝意を表する。

実験の部

(I) Quinoxaline 体の合成 i) 2-(*l*-Glycerodihydroxyethyl)-3-ketofuro[2,3-*b*] quinoxaline (I) の合成 AA 6 g を出来る限り少量の水に溶解し、これにアルコール 30 cc を加えよく混和する。次に quinone 3.6 g を加え 30° 前後で時々攪拌しながら完全に溶解させ、更に *o*-phenylenediamine 3.6 g を一気に加え完全に溶解させる。暗所に 1 夜放置して生ずる黄白色の沈澱を Soxhlet 抽出器を用い、無水エーテルにて橙黄色不純物を除き、次に無水アセトンにて脱色炭を使用し 2 回再結晶して微黄白色の微細な柱状品を得。操作中は光を遮ぎり且窒素ガス気流中で行うのが望ましい。融点を測定すると 80° 前後にて湿潤黄変し、118~120° で発泡分解する。粗製品の収量は非常に良いが再結晶に依り相当量を失う。空気に接すると容易に赤変し水溶液は紫藍色螢光を有する。C₁₂H₁₄O₆N₂ 計算値 C 50.69, H 4.96, N 9.93, 実験値 C 51.16, H 4.95, N 10.13.

ii) 7-(*l*-Glycerodihydroxyethyl)-13,14-furo[2,3-*b*; 3,4-*b'*]diquinoxaline (II) の合成 AA 3.8 g を含水アルコールに溶解し、これに quinone 2.4 g を加えて 30° 前後で完全に溶解させ、次に *o*-phenylenediamine 4.7 g を加えて冷暗所に 2 夜放置する。生じた黄色針状結晶をアルコールから再結晶する。mp 177° (decomp). 収量約 5 g. 水溶液、アルコール溶液は螢光を有しない。C₁₈H₁₈O₄N₄ 計算値 C 60.98, H 5.12, 実験値 C 60.98, H 4.84.

iii) 3-(*l*-Glycerodihydroxyethyl)-1-ketofuro[3,4-*b*]quinoxaline (III) の合成 7-(*l*-glycerodihydroxyethyl)-13,14-furo[2,3-*b*; 3,4-*b'*]diquinoxaline (II) 6 g を水 25 cc, *N* 塩酸 50 cc に溶解し、20° に 2 夜放置する。淡褐色の針状結晶が半球状に生ずるので冷後濾取、水から 2 回再結晶すると白色針状品を得。mp 185~186° (decomp). 収量は良くない。水溶液は螢光を有しない。C₁₂H₁₀O₄N₂ 計算値 C 58.51, H 4.10, 実験値 C 58.59, H 3.92.

iv) 2-(*d*-Glycerodihydroxyethyl)-3-ketofuro[2,3-*b*]quinoxaline (I') の合成 iso-AA 6 g を出来るだけ少量の水に溶解し、これにアルコール 30 cc を加えてよく混和する。次に quinone 3.6 g を加え 30° 前後で時々攪拌しながら完全に溶解させ、更に *o*-phenylenediamine 3.6 g を加え完全に溶解させた後に、暗所に 1 夜放置する。黄白色沈澱を濾取した後、無水精製アセトンにて 2 回再結晶を行えば殆んど無色の針状結晶を得。mp 165~167° (decomp). 収量は殆んど定量的である。空気に接すると容易に赤変し、水溶液は紫藍色螢光を有する。C₁₂H₁₂O₆N₂ 計算値 C 54.54, H 4.58, 実験値 C 54.33, H 4.59.

v) 7-(*d*-Glycerodihydroxyethyl)-13,14-furo[2,3-*b*; 3,4-*b'*]diquinoxaline (II') の合成 2-(*d*-glycerodihydroxyethyl)-3-ketofuro[2,3-*b*]quinoxaline (I') 1 mol を純アルコールに溶解し、これに *o*-phenylenediamine 1 mol を加え攪拌溶解させた後、冷暗所に 1 夜放置する。黄色針状結晶を濾取し純アルコールより再結晶する。mp 207° (decomp). 収量は殆んど定量的である。水溶液、アルコール溶液は螢光を有しない。C₁₈H₁₈O₄N₄ 計算値 C 60.98, H 5.12, 実験値 C 61.14, H 5.19.

vi) 3-(*d*-Glycerodihydroxyethyl)-1-ketofuro[3,4-*b*]quinoxaline (III') の合成 7-(*d*-glycerodihydroxyethyl)-13,14-furo[2,3-*b*; 3,4-*b'*]diquinoxaline (II') 6 g を水 25 cc, *N* 塩酸 50 cc に溶解し 20° に 2 日間放置する。淡褐色の針状結晶が半球状に生ずるのでこれを濾取、水から 2 回再結晶すると白色針状結晶を得。mp 179~182° (decomp). 収量は良くない。水溶液は螢光を有しない。C₁₂H₁₀O₄N₂ 計算値 C 58.51, H 4.10, 実験値 C 58.39, H 3.91.

(2) 反応液中の螢光体及び合成体の比較 i) 水溶液の螢光 第1報の定性反応に準じて作った AA 20 γ/cc 相当液の発する螢光と (I) の 4 mg を 3%メタ燐酸・8%酢酸 1 容量, *N*/500 硫酸 1 容量及びアルカリ液 2 容量の混和液 200 cc に溶かした液の発する螢光を比較すると、いずれも紫藍色であつて区別出来ない。これに反して (II) 及び (III) の対応する溶液には全く螢光が認められない。

上記の螢光はアルカリ性 (pH 9~10) にしても殆んど色調を変じないが、塩酸で pH 1 以下とすればいずれも青白色に変ずる。またハイドロサルファイトにより消滅するが、液を暫く振りまぜていと再び徐々に螢光が出現して来る。即ち、両螢光液の態度には相違が認められない。

ii) 螢光を励起する波長 i) で用いた両螢光液をそれぞれベックマン分光光度計の石英製液槽に入れ、暗室内で入射光の波長を水素放電管で 220~380 mμ, タングステン燈で 200~420 mμ 迄変えながら、如何なる波長の光で螢光が励起されるかを調べたところ、いずれも 350 mμ 近傍に於て紫藍色の螢光を発した。

iii) 螢光性物質のペーパークロマトグラム AA 2 mg/cc に対応する定性反応液及び (I), (II) 及び (III) の 2.5 mg/cc 水溶液を検液とし第3報に述べた方式によりペーパークロマトグラムを作つた。温度 18~20°, 時間 6~14 時間、その結果は Table I に示す如くである。

Table に挙げた以外に (III) よりは butanol : AcOH : H₂O で 0.7~0.8, ethyl acetate : AcOH : H₂O で 0.8 より高い位置に類黒色の吸収像を現わし、反応液よりはそれぞれの溶媒によつて 0.2, 0.4 附近に類黒色の吸収像が検出された。即ち、定性反応液中にはただ 1 種の螢光性物質が存在し、それは (I) であると認められる。

4) R. Kuhn : Ber. **67**, 893 (1934).6) 桜井：栄養と食糧 **5**, 97 (1952).5) R. Kuhn : Ber. **67**, 898 (1934).7) A. R. Surrey : J. Am. Chem. Soc. **73**, 2336 (1952).

Table I Fluorescent Spots of Reaction Mixture and Synthetic I, II or III.

Solvents Solutions	BuOH:AcOH:H ₂ O	AcOEt:AcOH:H ₂ O	Benzyl alcohol	Amyl alcohol
Reaction mixture	0.63	0.87	0.61~0.66	0.32
I	0.64	0.87	0.68	0.34
II and III	None	None	None	None

iv) 紫外線吸収スペクトラム Kuhn⁴⁵⁾, 萩井⁶⁾ 及び Surrey⁷⁾ 等によれば 2 又は 3 の位置に特定の置換基を有する quinoxaline 体は 200~400 m μ の紫外線部に特有の吸収を有するという。それゆえに定性反応液の吸収スペクトルを (I), (II) 及び (III) のそれと比べてみた。但し、反応液中には蛍光性物質の外に未反応の DAA, OPD を始めとして、メタ磷酸、酢酸、ヨウ素イオン、チオ硫酸ナトリウム、硼砂及び水酸化ナトリウムが共存しているのでこれら随伴物質自体による吸収あるいは目的物のスペクトラムに及ぼす影響を考慮した。

(a) DAA による吸収 Herbert⁸⁾ によれば塩素で酸化して作った DAA 水溶液は 280 m μ 以上で認むべき吸収を示さぬという。著者は 400 mg の AA を 3%メタ磷酸・8%酢酸 25 cc に溶かし、N ヨウ素液で酸化後 N/100 チオ硫酸ナトリウム液で過剰のヨウ素を去り N/500 硫酸で 50 cc とし、アルカリ液でメスフラスコに洗い込んで 100 cc としたものの (4 mg/cc の AA に相当する DAA 液) が液厚 1 cm で示す吸収曲線は、Fig. 2, ① の如くで、280 m μ 以上には何等影響しないことを確めた。

次に Mohler⁹⁾ に準じ AA を硫酸銅液 (Cu⁺⁺ として 0.5×10^{-3} mol 含有) に 100~200 γ /cc の濃度に溶かした液に 5° で水洗空気を 0.5~1 時間導通したものも Fig. 2, ② の如くに 280 m μ 以上には吸収を現わさない。

(b) 溶媒による吸収 アルカリ及び 3%メタ磷酸は 230 m μ 以上を殆んど吸収しないが、8%酢酸とヨウ素イオンが 240 m μ 以下をかなり吸収するために反応液に於て 240 m μ 以下の短波長部分の吸収は測れない。

(c) OPD による吸収 OPD は 20 γ /cc の水溶液でも 250 m μ 以下を強く吸収し、また 270~290 m μ の間 (極大は 280~285 m μ) にも吸収を示す。OPD を 3%メタ磷酸・8%酢酸 1 容量、N/500 硫酸 1 容量及びアルカリ液 2 容量の混和液に 25 γ /cc の濃度に溶かした液の吸収曲線は Fig. 2, ③ に示す如くである。従つて反応液中にもし OPD 量がこの程度残つていたときには 250 m μ 以下及び 270~290 m μ に於ける蛍光性物質の吸収測定にかなり影響するであろうが、反応液中の OPD 量を DAA との結合に必要な量より僅かに過剰な程度に止めておけば 270 m μ 以上では吸収を示さなくなる。

以上 (a)~(c) の予試験により定性反応液の吸収曲線は反応液中に新生した蛍光性物質の吸収曲線に近似するであろうことが予想されたので次にその測定を行った。

(d) 反応液の吸収曲線 (イ) ヨウ素酸化・定性反応条件の場合 AA を 3%メタ磷酸・8%酢酸に溶かし、1 mg/cc の溶液とし、その 2 cc をとり N/10 ヨウ素液で酸化し、過剰のヨウ素を N/100 チオ硫酸ナトリウム液で去り、3%メタ磷酸・8%酢酸で 25 cc としたものを試料として、Table II の如く対照液と検液を作り、15 時間放置後紫外線吸収曲線を測つた。その結果は Fig. 3, ① の如くである。

Fig. 2

Fig. 3

8) R. W. Herbert: J. Chem. Soc. 1932, 1270.

9) H. Mohler: Helv. Chim. Acta 21, 485 (1938).

Table II

Constituents (cc.)	Solutions	Control	Solution tested
80 γ /cc. DAA solution		5	5
OPD solution*		0	5
N/500 H ₂ SO ₄		5	0
Alkali solution**		10	10
Total (cc.)		20	20

* 5 mg. OPD in 100 cc. N/500 H₂SO₄

** cf. Report I

結果として反応液中には 245~250 m μ の間に溶媒や OPD には見られない plateau を有し, 280~290 m μ の間には OPD に似てこれより強い吸収を起すとともに, 340~350 m μ の間に第3の吸収極大を持つ新しい物質が生じていることがわかった. 吸収極小は 265 m μ 及び 315 m μ に見出された.

(ロ) 空気酸化・定性反応条件の場合 次に (イ) のヨウ素酸化を空気酸化にかえた場合の吸収を調べた. 即ち (iv) の (a) に準じて AA を硫酸銅液に 160 γ /cc の濃度に溶かし, 5 $^{\circ}$, 0.5 時間通気後 6%メタ磷酸・16%酢酸で2倍に稀めたものを試料として Table III の如く対照液と検液を作り, 15 時間放置後紫外線吸収曲線を測った. その結果は Fig. 4, ① の如くである.

Table III

Constituents (cc.)	Solutions	Control	Solution tested
80 γ /cc. DAA solution		5	5
OPD solution		0	5
N/500 H ₂ SO ₄		5	0
Alkali solution		10	10
Total (cc.)		20	20

Fig. 4, ① の形状は Fig. 3 と相似で 245~250 m μ 間の plateau 280~290 m μ 及び 340 m μ 近傍の吸収極大あるいは 265 m μ 及び 315 m μ に於ける吸収極小等より見て同一の反応物質が新生している.

(ハ) 空気酸化・水溶液の場合 (ロ) に準じ空気酸化により作った DAA 液の一部を水で 80 γ /cc の AA に相当するように稀めたものを試料とし Table IV の如く対照液と検液を作り, 15 時間放置後紫外線吸収曲線を測った. その結果は Fig. 4, ② の如くである.

この曲線は (ロ) で得たものと殆んど一致し, ヨウ素イオン及び溶媒に基く短波長部の盲吸収がないので反応物質による 200~250 m μ の間の吸収を確かめることが出来た.

以上 (d) の (イ)~(ハ) の実験によつて定性反応の条件の下で生ずる反応物質が 245~250 m μ に plateau

Fig. 4

Fig. 5

Table IV

Constituents (cc.)	Solutions	Control	Solution tested
80 γ /cc. DAA solution		5	5
OPD solution*		0	5
H ₂ O		15	10
Total (cc.)		20	20

* 5 mg. % aqueous solution

を現わし、280~290 $m\mu$ 及び 340~350 $m\mu$ に吸収極大を有すること及び定性反応の条件と異つた Ohle²⁾ の合成条件に近い中性水溶液中にも同一の吸収を持つた物質が生ずる事実が確認された。また最後の実験により反応物質は水溶液中で 215 $m\mu$ 及び 230 $m\mu$ 近傍にさらに1組の吸収極小及び極大を有することも知り得た。

(e) 合成体 (I), (II) 及び (III) の吸収曲線 (I) で合成した (I), 及び (II) 及び (III) の水溶液 (20 γ /cc) の示す吸収曲線はそれぞれ Fig. 5, 6 及び 7 の如くである。

即ち, (I) は 215 $m\mu$ の第1の吸収極小, 228~230 $m\mu$ に第1の吸収極大を有し, 次で 245~250 $m\mu$ に plateau を現わし, さらに 265 $m\mu$ と 292~295 $m\mu$ に1組, 320 $m\mu$ と 346~348 $m\mu$ に1組計2組の吸収極小及び極大を示し, 曲線の特徴は Fig. 3, Fig. 4, ① 及び ② に酷似し, なかんずく Fig. 4, ② に殆んど一致している。

これに反して (II) は 220 $m\mu$ に第1の吸収極小, 243 $m\mu$ に第1の極大を有している点は (I) に似ているが, 極大の ϵ 値は (I) よりかなり大きく, 次に 270 $m\mu$ にやや緩徐な吸収極小を画いた後に再び徐々に吸収を増し, 323~325 $m\mu$ の間に第2の極大を作り以後急激に吸収を減じている。

また (III) にあつては 221 $m\mu$ に第1の吸収極小, 246~247 $m\mu$ に第1の極大を有している点は (I) 及び (II) に酷似しているが, 極大の ϵ 値は (II) よりさらに大きく, 次に 277 $m\mu$ にゆるやかな極小を画いた後吸収を増して (II) より大きい第2の極大を 326~328 $m\mu$ に作り以後急速に吸収を減じている。

以上3個の吸収曲線を比較すれば, (I) が 245~250 $m\mu$ に plateau 及び 290~295 $m\mu$ と 345~350 $m\mu$ に2個の吸収極大を有するのに対して (II) 及び (III) には plateau がなく, 290~295 $m\mu$ の吸収極大を失うとともに 320~330 $m\mu$ に唯1個の吸収極大を現わすに止まる。然してこれ等の内 Fig. 3~4 に示した定性反応液の吸収曲線と符合するものは明らかに (I) によるもののみである。

(f) メタ磷酸・アルカリ混和液中に於ける (I) の吸収曲線 (I) を 3%メタ磷酸・8%酢酸 1容量, N/500 硫酸 1容量及びアルカリ液 2容量の混和液に 20 γ /cc の濃度に溶かしたものの吸収曲線は Fig. 3, ② の如くであつた。plateau の形状が少しく歪んだ以外には吸収極大及び極小に動きは認められず Fig. 5 と全く近似している。従つて (I) の吸収または反応物質の吸収は溶媒の如何に基く外的条件では殆んど左右されないものと思われる。

以上 (a)~(f) に至る実験結果より定性反応液が現わす反応生成物質による紫外線吸収曲線は液中に生じた合成体 (I) に基くものであると断定する。

Fig. 6

Fig. 7

なお、Table V, VI 及び VII に (I), (II) 及び (III) の molecular extinction (換算値) を掲げる。c=20 γ /cc, 液厚 1 cm の水溶液を用い、ベックマン分光光度計で測つた。これと同時に (I'), (II') 及び (III') につき上と同条件で吸収を測つたが、それぞれの対応する合成体の吸光度は誤差の範囲内で一致し、両系化合物の判別は困難であつた。

Table V Molecular Extinction of 2-(*l*-Glycerodihydroxyethyl)-3-ketofuro[2,3-*b*]-quinoxaline (expressed as $10^{-4} \times$ molecular extinction)

λ (m μ)	$\epsilon \times 10^{-4}$	λ (m μ)	$\epsilon \times 10^{-4}$	λ (m μ)	$\epsilon \times 10^{-4}$	λ (m μ)	$\epsilon \times 10^{-4}$	λ (m μ)	$\epsilon \times 10^{-4}$
200	2.54	240	0.81	275	0.48	315	0.46	350	0.60
205	2.54	245	0.70	280	0.56	320	0.47	355	0.55
210	1.68	248	0.72	285	0.60	325	0.49	360	0.49
215	1.33	250	0.73	290	0.61	330	0.53	370	0.34
220	1.55	255	0.71	295	0.60	335	0.57	380	0.16
225	1.85	260	0.37	300	0.55	340	0.59	390	0.16
230	1.92	265	0.32	305	0.50	345	0.61	400	0.03
235	1.56	270	0.38	310	0.47	348	0.60		

Table VI Molecular Extinction of 7-(*l*-Glycerodihydroxyethyl)-13,14-furo[2,3-*b*; 3,4-*b'*]diquinoxaline (expressed as $10^{-4} \times$ molecular extinction)

λ (m μ)	$\epsilon \times 10^{-4}$	λ (m μ)	$\epsilon \times 10^{-4}$	λ (m μ)	$\epsilon \times 10^{-4}$	λ (m μ)	$\epsilon \times 10^{-4}$	λ (m μ)	$\epsilon \times 10^{-4}$
215	2.66	245	3.67	285	0.59	325	0.81	370	0.11
220	2.16	250	2.85	290	0.60	330	0.78	380	0.09
221	2.13	255	1.47	295	0.61	335	0.67	390	0.05
225	2.23	260	0.83	300	0.62	340	0.57	400	0.03
230	2.59	265	0.60	305	0.64	345	0.44		
235	3.13	270	0.53	310	0.68	350	0.33		
240	3.77	275	0.54	315	0.73	355	0.25		
243	3.91	280	0.56	320	0.77	360	0.19		

Table VII Molecular Extinction of 3-(*l*-Glycerodihydroxyethyl)-1-ketofuro[3,4-*b*]-quinoxaline (expressed as $10^{-4} \times$ molecular extinction)

λ (m μ)	$\epsilon \times 10^{-4}$	λ (m μ)	$\epsilon \times 10^{-4}$	λ (m μ)	$\epsilon \times 10^{-4}$	λ (m μ)	$\epsilon \times 10^{-4}$	λ (m μ)	$\epsilon \times 10^{-4}$
215	1.10	247	2.98	285	0.13	325	0.83	360	0.18
220	9.09	250	2.77	290	0.16	328	0.84	370	0.10
221	0.88	255	1.58	295	0.22	330	0.83	380	0.04
225	0.91	260	0.50	300	0.30	335	0.76	390	0.02
230	1.04	265	0.20	305	0.40	340	0.61	400	0.01
235	1.48	270	0.12	310	0.51	345	0.47		
240	2.23	275	0.10	315	0.63	350	0.34		
245	2.88	280	0.11	320	0.75	355	0.25		

v) Phenylhydrazone の単離と同定 i)~iv) によつて定性反応液中の螢光性物質が (I) であることは確定したと思うが、この螢光性物質は濃縮の途中で容易に分解するため、これを稀薄な定性反応液中より単離し得なかつたので、誘導体として証明しようと試みた。即ち (I) は側鎖にケト基を有し Ohle も (I) の phenylhydrazone (以後ヒドラゾンと略記する) を得ている。そこで著者は定性反応液として AA 500 mg を 3%メタ磷酸・8%酢酸 50 cc に溶かし、Nヨウ素液 5.69 cc で酸化し過剰のヨウ素を N/100 チオ硫酸ナトリウム液で除去後、OPD 350 mg (理論量 317 mg) を N/500 硫酸 50 cc に溶かしたものを加えて混和後アルカリ液 125 cc を加え (pH 4.0) 1 夜放置する。翌朝 N 水酸化ナトリウム液 84 cc を加えて pH を 7.0 に調整し、水で 350 cc とする。これに塩酸フェニルヒドラジン 450 mg 及び酢酸ナトリウム 675 mg を 9 cc の水に溶かした

ものを加え 50° で 2 時間加温後 1 夜放置して析出する橙赤色のヒドラゾンを経取、水洗、乾燥し、アルコールより再結晶、橙赤色針状結晶を得る。mp 226° (decomp). 後述する合成体 (I) のヒドラゾンと混融しても mp は変らない。収量 0.6 g (60%). $C_{18}H_{18}O_4N_4$ 計算値 C 60.98, H 5.12, N 15.85, 実験値 C 61.19, H 4.99, N 15.92. $[\alpha]_D^{16} : +63.6^\circ$ ($c=0.22$, $l=1$, ビリジン).

本品のビリジン溶液につき butanol : alcohol : $H_2O = 4 : 1 : 4$ を溶媒とし 15° でペーパクロマトグラフィーを行い、 $R_f = 0.82$ を得、この値は合成体 (I) のヒドラゾンより得た R_f 値と全く一致した。これとは別に合成体 (I) のヒドラゾンを次の如くして作った。

即ち、(I) 0.5 g を無水アルコール 20 cc に溶かし、塩酸フェニルヒドラジン 0.2 g 及び酢酸ナトリウム 0.3 g を加え、40° で 1 時間加温し、放冷すればヒドラゾンが析出する。経取、水洗。乾燥後アルコールより再結晶。橙赤色針状結晶。mp 226° (decomp), 収量 0.55 g (87%). $C_{18}H_{18}O_4N_4$ 計算値 上述と同じ、実験値 C 61.04, H 5.31, N 15.22. $[\alpha]_D^{16} : +65.4^\circ$.

国立衛生試験所

Summary

In order to understand the reaction mechanism whereby a solution of dehydroascorbic acid shows fluorescence upon the addition of *o*-phenylenediamine solution, 2-(*l*-glycerodihydroxyethyl)-3-ketofuro[2,3-*b*]quinoxaline (I), 7-(*l*-glycerodihydroxyethyl)-13,14-furo[2,3-*b*; 3,4-*b'*]diquinoxaline (II) and 3-(*l*-glycerodihydroxyethyl)-1-ketofuro[3,4-*b*]quinoxaline (III) were prepared and the nature of the fluorescence shown by the aqueous solutions of these compounds, R_f values of the fluorescent substance, ultraviolet absorption spectra, and the properties of respective phenylhydrazones were examined. It was found from these experimental results that the only one that gave completely identical properties as the reaction mixture was that from (I).

(Received December 26, 1952)

97. 小川俊太郎： ビタミン C の螢光反応 (第 6 報) 総ビタミン C の比螢光定量法

Shuntaro Ogawa: Fluorescent Reaction of Vitamin C. VI. Fluorometric Determination of Total Vitamin C.

(National Hygienic Laboratory)

既報¹⁻⁵⁾ したように著者の見出したデヒドロアスコルビン酸 (DAA) と *o*-phenylenediamine (OPD) との縮合的螢光反応は極めて特異的であるとともに、検液 1 cc 中に僅々数 γ 程度の DAA (酸化前の AA 量を含めて) が存在すれば第 2 報で報告した螢光光度計により容易にその強度を測定することが出来る。そこで著者は本反応を総ビタミン C (TVC, アスコルビン酸 AA とデヒドロアスコルビン酸 DAA との総和を AA の量として表わしたもの) の比螢光定量に應用しようと考え、その基礎実験を行い、満足すべき成績を得たのでこれを第 6 報として報告したいと思う。

本 法 の 原 理

本法はまず検液中の AA を定量的に酸化して DAA としこれと始めより共存していた DAA の総和即ち TVC に OPD を常温で作用させて生ずる 2-(*l*-glycerodihydroxyethyl)-3-ketofuro[2,3-*b*]quinoxaline の紫藍色螢光を標準 AA 液の螢光と螢光光度計によつて比較し定量を行わんとする方法である。その基本となる反応式を Fig. 1 に示す。

1) 小川：衛生試報 70, 72 (1952).

2-5) 小川：本誌 73, 54, 59, 94, 309, (1953).