炭水化物系化合物の自動酸化分解 (第 5 報¹⁾)

アスコルビン酸の褐変分解 その 1

小沢樹夫, 中村好志

静岡薬科大学²⁾Studies on the Autoxidation of Carbohydrate and Its Derivatives. V.¹⁾

Browning Decomposition of L-Ascorbic Acid. (I)

TATUO OZAWA and YOSHIYUKI NAKAMURA

Shizuoka College of Pharmacy²⁾

(Received October 29, 1969)

On standing at room temperature, the ethanol solution of ascorbic acid (AAH₂), 5,6-isopropylidene ascorbic acid (Ip-AAH₂) or dehydroascorbic acid (DHA) and a variety of amines (Table I) in the ratio 1 : 2 moles was discoloured to brown under autoxidative decomposition. It is evident that 1) O₂ was required for the browning discoloration of AAH₂-amine system, but not required for the browning of DHA-amine system; 2) the browning intensities of the assayed amines were in the following order: primary amines > secondary amines > tertiary amines; and it was proportional to their pK_a value.

As a decomposed product dioxalamide II was obtained from the system of 1) AAH₂ and the amines showed in Table I and 4, 2) Ip-AAH₂ and the arylamines in Table II, 3) DHA and the arylamines in Table III and IV.

Oxalamide II and another two deposits, arylamine salt of 2-dehydroxy-2-arylamino ascorbic acid (I) and 2,3-didehydroxy-2,3-diarylamino ascorbic acid (III), were separated from the browning solution of AAH₂-arylamine system. Five more decomposed were obtained from the mother solution: N,N'-mesoxalamide hydrate (IV), N-aryloxamic acid (V), azobenzene derivatives (VI), glyceric acid (VII) and L-threonic acid (VIII).

82.5% of the specific radioactivity was measured in II obtained from AAH₂-¹⁴C₁ and *p*-toluidine. From this result it was deduced that II was formed by fragmentation of the C₂-C₃ bond and IV and VII formed by fragmentation of the C₃-C₄ bond of AAH₂.

AAH₂ was decomposed to II, IV *etc.* through AAH· freeradically under autoxidation.

Ascorbic acid (AAH₂) の自動酸化によって dehydroascorbic acid (DHA) ができる中間体として AAH₂ の monodehydro 型の free radical (AAH·) が生成することは, Weisberger ら³⁾ が初めて報告, ついで Calcutt⁴⁾ は DHA ができるとき過酸化水素が生成し, これによって連続的に AAH₂ が DHA に酸化されていくと説明している. Yamazaki ら⁵⁾ は電子スピン共鳴 (ESR) 吸収波より AAH· の生成を実証, Levandoski ら⁶⁾ は戸紙分配クロマトグラフ (PPC) を使って AAH· が AAH₂ と complex 体となっていることを報告している. AAH· の構造については, Kluge ら⁷⁾ は NADH に対する AAH₂ のメチル化合物の酸化活性および, π -electron density 分布から, また Foerster ら⁸⁾ は ESR の吸収波の解析により, とともに AAH₂ の 3 位の OH 基の H が引き抜かれた構造であるといっている. 神谷, 中林⁹⁾ は AAH₂ の苛性ソーダ水溶液の過酸化水素酸化分解を検

1) 第 4 報: 小沢樹夫, 木苗直秀, 薬誌, **89**, 1581 (1969).

2) Location: 160, Oshika, Shizuoka.

3) A. Weisberger, J.E. Luvalle, D.S. Thomas, Jr., *J. Am. Chem. Soc.*, **65**, 1934 (1943).

4) G. Calcutt, *Experientia*, **7**, 26 (1951) [*C.A.*, **45**, 67086].

5) I. Yamazaki, H.S. Marson, L. Piette, *J. Biol. Chem.*, **235**, 2444 (1960).

6) N.G. Levandoski, E.M. Baker, J.E. Canham, *Biochemistry*, **3**, 1465 (1964).

7) H. Kluge, R. Rasch, B. Brux, H. Frunder, *Biochim. Biophys. Acta*, **141**, 260 (1967).

8) G. Foerster, W. Weis, H. Staudinger, *Ann.*, **690**, 166 (1965).

9) 神谷真太郎, 中林敏郎, ビタミン, **13**, 246 (1957).

討し、シュウ酸, glyceric acid, glycollic acid, formic acid, L-threonic acid, 炭酸ガスを分解物としてとり, また第二鉄イオンの存在する中性水溶液中で過酸化水素酸化する Fenton 酸化では, 以上の分解物の他に, さらに 2-ketothreonic acid lactone を証明し, AAH_2 はその γ -ラクトン環の $\text{C}_2\text{-C}_3$ bond で切断される分解様式を報告した. AAH_2 , DHA のアミン類との反応では, DHA と aniline から diketoguronic acid の enol 型 monoanil の dianiline 塩の生成,¹⁰⁾ AAH_2 と o-phenylene diamine から quinoxaline 化合物の合成,¹¹⁾ DHA の bis-phenylhydrazone より pyrazolone 体の生成¹²⁾ の報告があるが, これらは AAH_2 の褐変分解を検討したものではない.

次いで神谷¹³⁾ は DHA の 5% 硫酸分解で, xylosone, 5-methyl-3,4-dehydroxytetrone などのレダクトンおよび 3-hydroxyfurfural, 2-furoic acid をとり, また AAH_2 , DHA の 10% 苛性ソーダでの熱時および室温分解によるシュウ酸, L-threonic acid の生成, さらに L-threonic acid の 2 次分解による glyceric acid, lactic acid, シュウ酸の生成を認め, AAH_2 の褐変分解の機構を述べている. Kurata ら¹⁴⁾ は AAH_2 または AAH_2 と DHA の混合水溶液は DHA のみの水溶液よりも褐変度の強いことを認め, Kurata, Sakurai¹⁵⁾ は AAH_2 は Clark-Lubs の緩衝液 (pH 2.2) 中で非酸化的に中間体 3-deoxy-pentosone を経て furfural を生成する経路, DHA が 5% 硫酸中で酸化的に分解して furfural, ethylglyoxal, 2-keto-3-deoxypentono- γ -lactone, xylosone を生成する機構を報告しているが, これら褐変分解は, その溶液の pH によって様相がかなり相違していることがわかる. 最近 Tatum ら¹⁶⁾ は AAH_2 水溶液を直火で加熱し, その分解物をガスクロマトグラフで検索し, 神谷の報告した 2-furoic acid を含め 15 種の分解物をとらえているが, これらは 2 次, 3 次的な分解反応物である. また Amadori ら¹⁷⁾ は DHA を 20% アンモニア中に室温に密閉して 12 時間おくか, 水溶液を phenylhydrazine

TABLE I. AAH_2 -Amine Reaction (under O_2)

Used amines	Coloring grade ^{a)}		Deposited compound from solution		
	After 2 days	After 1 month	I	II	III
p-Anisidine	++	+++	+	+	+
p-Phenetidine	++	+++	+	+	+
p-Toluidine	++	+++	—	+	+
Aniline	+	++	—	+	—
Pyridine	±	+	—	—	—
Diphenylamine	—	±	—	—	—
Diethanolamine	—	±	—	—	—
Mono Ethanolamine	±	+	—	+	—
Piperidine	±	+	—	—	—
n-Butylamine	++	+++	—	—	—
n-Hexylamine	++	+++	—	+	—
L-Glycine ^{b)}	± ^{c)}	++ ^{c)}	—	—	—
L-Alanine ^{b)}	± ^{c)}	++ ^{c)}	—	—	—

a) —: not discoloured, +: yellow, ++: brown, +++: dark brown

b) solvent used: dil. ethanol (1:1)

c) Discolored to red.

10) H. Hasselquist, *Arkiv Kemi*, **4**, 374 (1952).

11) H. Erlbach, H. Ohle, *Chem. Ber.*, **67**, 1750 (1934); H. Dahn, H. Moll, *Helv. Chim. Acta*, **47**, 1860 (1964); G. Henseke, K. Dittrich, *Chem. Ber.*, **92**, 1550 (1959).

12) H. Ohle, G. Böckmann, *Chem. Ber.*, **67**, 1750 (1934); H. El Khadem, S.H. El Ashry, *J. Chem. Soc.*, **1968**, 2247.

13) 神谷真太郎, 農化, **33**, 398 (1959); **34**, 8 (1960).

14) T. Kurata, H. Wakabayashi, Y. Sakurai, *Agr. Biol. Chem.*, **31**, 170 (1967).

15) T. Kurata, Y. Sakurai, *Agr. Biol. Chem.*, **31**, 177 (1967).

16) J.H. Tatum, P.E. Shaw, R.E. Berry, *J. Agr. Food Chem.*, **17**, 39 (1969).

17) E. Amadori, W. Weis, *Ann.*, **724**, 211 (1969).

TABLE II. Ip-AAH₂-Amine Reaction (under O₂)

Used amines	Coloring grade		Deposited compound from solution		
	After 2 days	After 1 month	I	II	III
<i>p</i> -Anisidine	++	+++	—	+	—
<i>p</i> -Phenetidine	++	+++	—	+	—
<i>p</i> -Toluidine	++	+++	—	+	—

All the symbols used are the same as in Table I.

TABLE III. DHA-Amine Reaction (under O₂)

Used amines	Coloring grade		Deposited compound from solution		
	After 2 days	After 1 month	I	II	III
<i>p</i> -Anisidine	++	+++	—	+	—
<i>p</i> -Phenetidine	++	+++	—	+	—
<i>p</i> -Toluidine	++	+++	—	+	—
L-Glycine	+	++ ^{a)}	—	—	—
L-Alanine	+	++ ^{a)}	—	—	—

All the symbols used are the same as in Table I.

^{a)} Discolored to red.

TABLE IV. AAH₂, DHA-Amine Reactions (under N₂)

Used amines	AAH ₂					DHA				
	Coloring grade		Deposited compound from solution			Coloring grade		Deposited compound		
	After 2 days	After 1 month	I	II	III	After 2 days	After 1 month	I	II	III
<i>p</i> -Anisidine	—	—	—	—	—	++	+++	—	+	—
<i>p</i> -Toluidine	—	—	—	—	—	++	+++	—	+	—
L-Glycine	—	—	—	—	—	+ ^{a)}	++ ^{a)}	—	—	—

All the symbols used are the same as in Table I.

^{a)} Discolored to red.

と1時間加熱するか, aniline と ethanol 中1時間加熱して, それぞれ oxamide, oxalic acid, diphenylhydrazide, oxanilide をとり, シュウ酸が容易に分解してできると報告している.

われわれは炭水化物系化合物の自動酸化分解研究の一環として, AAH₂, DHA を有機アミンを含む pH 5.0 以上の微酸性から微アルカリ性の ethanol 溶液中で室温で自動酸化させ, その褐変分解の機構を検討し, 分解反応物を確認することによって, 分解の様式を決めようとした.

AAH₂, DHA の褐変に関与する因子として, pH, 温度, 第一鉄イオン, 第二鉄イオン, 第二銅イオンなどの金属イオンがあるが, ここでは金属イオンは特に加えず, AAH₂, 5,6-isopropylidene-AAH₂ (Ip-AAH₂), DHA 各1モルに対しアミン2モルの比率でとかした ethanol 溶液を室温に静置し, 2日後と1ヵ月後の褐変度を比較した. アミンは *p*-toluidine (PT) を使用すると, 褐変液中から容易に N,N'-di-*p*-tolylloxamide (II_{PT}) が分解物として析出してくることを知ったので, その他のアミンについても着色の程度と oxamide II の生成のいかを比較検討した結果が Table I, II, III である. また酸素の必要のいかをみるために, 窒素中でおこなった結果が Table IV である. 着色度を肉眼的に三段階に分け, 赤褐色または褐色⁺⁺⁺, 淡褐色, 黄褐色⁺⁺, 淡黄色, 淡黄

TABLE V. Dissociation Constants of Used Primary Amines^{a)}

Amines	pK _a	Amines	pK _a
Aniline	4.58	<i>n</i> -Hexylamine	10.64
<i>p</i> -Toluidine	5.08	mono-Ethanolamine	9.45
<i>p</i> -Phenetidine	5.28	L-Glycine	9.62
<i>p</i> -Anisidine	5.34	L-Alanine	9.82
<i>n</i> -Butylamine	10.61		

a) A. Albert, E.P. Serjeant, "Ionization Constants of Acids and Bases," Methuen & Co., Ltd., Great Britain, 1962.

褐色を+とした。その結果褐変度では、1) 1級アミン類では強く着色、2級、3級アミン類では着色が弱く、これらは加熱してはじめて徐々に着色してくる。2) 1級アミンの褐変活性は Table V に示すように、その塩基度 pK_a に比例する。3) DHA は AAH₂ よりも褐変度が強い。4) Ip-AAH₂ は AAH₂ より褐変度が強い。5) AAH₂ は酸素存在下でのみ褐変化し、窒素中では褐変がおこらないが、DHA では窒素中でも酸素中と同様に褐変化する。以上のことから AAH₂ の褐変は free radical AAH₂· または DHA を経てはじめて起こることがわかった。また AAH₂-amine の褐変は通気して酸素を十分に供給した場合、空気中に静置した場合、密栓して放置した場合を比較したが、褐変度に有意の差が認められず、また AAH₂、Ip-AAH₂、DHA いずれの場合も炭酸ガスの発生が認められなかった。シュウ酸の生成は AAH₂、Ip-AAH₂、DHA と各アミンの組合せについて同じく Table I—IV で示したが、PT, *p*-anisidine (PA), *p*-phenetidine (PP), aniline, monoethanolamine, *n*-hexylamine の各アミンおよび phenylhydrazine と AAH₂ とのそれぞれの組合せ、PA, PP または PT と Ip-AAH₂ の組合せ、PT, PA, PP と DHA の組合せの 13 例の場合および窒素中での PT, PA と DHA の組合せでは、各アミンの di-oxalamide II が生成してくる。換言すれば芳香族アミンでは AAH₂、Ip-AAH₂、DHA との組合せでは、いずれも II を生成するが、窒素中では AAH₂ からは生成せず、DHA と芳香族アミンの組合せでのみ生成することを知った。すなわち DHA の褐変分解では酸素を必要とせず分解してシュウ酸ができる。シュウ酸の析出に要する日数と AAH₂ からの収量をその他のデータとともに Table VI に示す。シュウ酸はいずれの場合も 1 週間以内、多くは 2 日後から析出が始まり、PA では 10%, PT 13.4%, PP 10.2% の収率であった。Amadori ら¹⁷⁾ はアンモニア, aniline, phenylhydrazine と DHA からそれぞれ 24%, 10% および 15% の収率でシュウ酸を得ているが、われわれの場合は PT, PA, PP, aniline, monoethanolamine, hexylamine, phenylhydrazine の 7 化合物と AAH₂、PT, PA, PP と Ip-AAH₂ の組合せ、PT, PA, PP と DHA の組合せの 13 例において、それぞれシュウ酸の生成することを確認した。また Ip-AAH₂ と PT でのシュウ酸の収率は AAH₂ の場合と同程度の 14.9% であったが、DHA と PT では 2 倍以上の 33% であった。

TABLE VI. Data of RNHCO obtained in AAH₂-Amine Reactions

R	mp (°C)	The days required	Yield (%)	Formula	Analysis (%)					
					Calcd.			Found		
					C	H	N	C	H	N
-C ₆ H ₄ OCH ₃ (<i>p</i>)	259—260 ^{a)}	2	10.0	C ₁₆ H ₁₆ O ₄ N ₂	63.99	5.37	9.33	63.83	5.21	9.39
-C ₆ H ₄ OC ₂ H ₅ (<i>p</i>)	260—261 ^{b)}	2	10.2	C ₁₈ H ₂₀ O ₄ N ₂	65.86	6.31	8.53	65.84	6.14	8.53
-C ₆ H ₄ CH ₃ (<i>p</i>)	268—269 ^{c)}	3—4	13.4 ^{d)}	C ₁₆ H ₁₆ O ₂ N ₂	71.62	6.01	10.44	71.51	6.08	10.41
-C ₆ H ₅	246—247 ^{e)}	5—6	9.3	C ₁₄ H ₁₂ O ₂ N ₂	69.99	5.03	11.66	69.79	5.06	11.49
-NH-C ₆ H ₅	265—267 ^{f)}	4—6	1.1	C ₁₄ H ₁₄ O ₂ N ₄	62.68	4.51	20.89	62.59	4.60	20.92
-CH ₂ -CH ₂ OH	170—171 ^{g)}	2	8.5	C ₆ H ₁₂ O ₄ N ₂	40.90	6.87	15.90	40.67	6.80	15.85
-(CH ₂) ₅ -CH ₃	134—135	2	6.1	C ₁₄ H ₂₈ O ₂ N ₂	65.58	11.01	10.93	65.44	10.83	11.14

a) Beilstein, 13, 472. 260°; DHA-PT reaction;

b) Ibid., 13, 473. 261°; e) Ibid., 12, 284. 246—247°;

c) Ibid., 12, 931. 269°; f) Ibid., 15, 269. 274°;

d) 14.9% in Ip-AAH₂-PT reaction, 33% in g) Ibid., 4, 285. 167—168°

TABLE VII. The Formation Rate of Products in AAH₂-PT Reaction

Compounds	Starting materials gr. (mmole)	Products (Yield)		
		gr.	mmole	% based on AAH ₂
AAH ₂	8.5 (5.0)	—	—	—
PT	10.5 (10.0)	0.6 ^{a)}	0.56 ^{a)}	5.6 ^{a, b)}
II _{PT}	—	1.8	0.67	13.4
III _{PT}	—	2.7	0.38	7.6
IV _{PT}	—	3.4	1.08	21.6
V _{PT}	—	0.4	0.22	4.4
VI _{PT}	—	1.0	0.48	9.6 ^{b)}
Melanoidine	—	8.2	—	—
Total	19.0	18.1	—	—

^{a)} recovered materials^{b)} Based on PT.

Table I—IV の 2-deoxy-2-arylamino-L-ascorbic acid の arylamine 塩 (I) (構造式: Chart 3) および 2,3-dehydroxy-2,3-diarylamino-L-ascorbic acid (III) (構造式: Chart 3) は II の生成と前後して析出しはじめ, III は I の析出が終った後, II と混合して析出してくる. I は AAH₂-PA, AAH₂-PP の組合せのみで生成, AAH₂-PT および PT, PA, PP と DHA の組合せでは得られなかった. III は PT, PA, PP と AAH₂ の各組合せで生成するが, DHA とこれらアミンからは生成しない. I, III は ethanol 可溶で, 難溶の II と容易に分離精製できる. AAH₂-PA からの I_{PA} は炭酸水素ナトリウム液にとかしエーテルで抽出すると I_{PA} 1 モルに対し 0.92 モルの PA が得られた. 1 個の enaminol 基をもつとして, Tillmann 試薬での滴定値¹⁸⁾ から分子量を求めると 399.4 で元素分析から得た C₂₀H₂₄O₇N₂ の分子量 404.4 とほぼ一致する. I_{PA} は融点 168.5—169° の淡黄色板状晶として ethanol から精製できるが, PA を含む ethanol 中でさらに褐変分解して di-oxamide II_{PA} が生ずる. アセチル化すると N-acetyl-*p*-anisidine を得たのみであるが, 2,4-dinitrophenylhydrazine (2,4-DNPH) により DHA-2,3-bis(2,4-dinitrophenylhydrazine) と同一物を得たこと, および赤外線 (IR), 紫外線 (UV) 吸収からみて I_{PA} は 2-dehydroxy-2-*p*-anisidino-L-ascorbic acid の *p*-anisidine 塩であることがわかった. I_{PP} は融点 169—169.5° で I_{PA} と同様の性質をもっている. 次の III はいずれも淡黄色結晶性で III_{PT}, 214—215°, III_{PA}, 202—203°, III_{PP}, 212—213° の融点を持ち, III_{PT} は Mass Spectrum *m/e*: 354 (M⁺), C₂₀H₂₂O₄N₂ の組成で, IR は 1715 cm⁻¹ に強い吸収を持ち, AAH₂ の 1750 cm⁻¹ のラクトン吸収より低波長にあるが, phenylhydrazine, 2,4-DNPH, thiosemicarbazide などのケトン試薬と反応せず, また過ヨウ素酸を消費して 1 モルから formaldehyde 0.87 モルが生成することから, 1715 cm⁻¹ の吸収は δ -lactone 吸収ではなく, γ -lactone 吸収が低波長にずれているものとみなされる. 本物質は不安定で空気中で徐々に着色分解してタール状物質と di-oxalamide II_{PT} になる. また過ヨウ素酸, 過酸化水素で酸化するといずれも II_{PT} が生成しうること, 過酸化水素酸化では N-*p*-tolyl-L-threonamide ができること, diacetyl 化物, isopropylidene 化物をつくること, DHA からは III_{PT} が生成しないことなどから, 本物質は 2,3-dehydroxy-2,3-di-*p*-toluidino-L-ascorbic acid であることがわかった. これは空気中では不安定であるが, PT を含む ethanol 中では AAH₂, DHA よりもはるかに安定で褐変しにくい. それはその構造からみて AAH₂ に対応する free radical が生成しにくいことに原因があると解釈する.

上述の I, II, III 以外の分解物を検索するために, PT-AAH₂ 反応液から I—III を除いた母液をさらに 0.5—1 カ月室温に放置した後, Chart 1 に示す常法により処理した. その結果分解物としてさらに, N,N'-di-*p*-tolylmeso-oxalamide hydrate (IV_{PT}), N-*p*-tolylloxamic acid (V_{PT}), azotoluene (VI_{PT}), glyceric acid (VII), L-threonic acid (VIII) を確認した.

AAH₂ のアミン存在下の褐変分解において, II, V のシュウ酸化合物は AAH₂ の C₂-C₃bond が切断され, C₁-

18) H. von Euler, D. Nomura, S. Adachi, K. Yamafuzi, "Grundlagen der Reducton-Chemie," Uchida-Rokakuho, Tokyo, 1960, p. 6.

Chart 1. Separation Procedure in AAH₂-PT Reaction

C₂ fragment からできたものであり、このことは AAH₂-¹⁴C₁ を使用しそれより生成した シュウ酸化合物の理論値の 82.5% の放射能が測定されたことで証明した。L-Threonic acid VIII も同様に C₂-C₃ bond の切断で生成したものであるが、IV と VII は C₃-C₄ bond の切断によるものである。AAH₂ から IV への分解はわれわれによって初めてみいだされたものである。このように AAH₂ の γ -lactone 環が C₂-C₃ と C₃-C₄ の 2 カ所で切断され、同時にアゾ化合物 VI の生成することは、AAH₂ では AAH $\cdot$ の free radical 的自動酸化分解と解釈すべきである (Chart 2,3). Chart 2 では AAH $\cdot$ から free radical 転位により F₂, F₃ 型および diketal 型の F₃-hydrate ができ、peroxyde を経て分解し II, IV, VII, VIII が生成してくる経路が考えられる。Chart 3 は I から 2-dehydroxy-2-arylamino 型 free radical F_{3a} ができ、これが F_{2a} から N-free radical をもつ FNa に転位し、これ

Chart 2

Chart 3

から $\text{ArN}\cdot$ が分離重合してアゾ化合物 VI が出現し、同時に F_2 が生成する。かくてこの褐変分解は free radical 分解であると推定する。

次に DHA の分解では、 AAH_2 の場合と違って窒素気流中でも分解されてシュウ酸が生成し、酸素を必要としないことの説明が Chart 4 である。DHA が共存する水分により diketal 型の hydrate¹⁹⁾ となり、これから $\text{H}\cdot$ が引き抜かれて F_{2H} , F_{3H} が生成、これが分解して II, IV, VIII が出現し、その間に酸素による peroxyde の生成の必要がないため、窒素中でもこの分解反応が進行すると説明する。

Chart 4

以上により有機アミンと共存する AAH_2 は pH 5.0 以上の微酸性から微アルカリ性の ethanol 中で室温で free radical 的な自動酸化分解をし、特に芳香族アミンの存在下では γ -lactone 環が C_2 - C_3 bond で切断されてシュウ酸と L-threonic acid が生成すると同時に、従来知られなかった C_3 - C_4 bond 切断をおこし、mesoxalic acid の hydrate 型が生成することが判明した。またアミンの一部がアゾ化合物に酸化されるが、これは free radical 的分解重合で説明される。Free radical は実証の段階に至っていないが、II—VIII の諸分解物は既知^{5,6,8)} の free radical $\text{AAH}\cdot$ より出発する自動酸化的分解反応として、最も適切にその経路が推察でき Chart 2,3,4 で示すことができる。

なお、DHA の分解については次報で詳報する。

19) H. Albers, E. Müller, H. Dietz, *Ann.*, 334, 243 (1963).

実験の部²⁰⁾

装置 IR spectrum は日立 EPI-G2, UV spectrum は日立 EPS-2U, Mass Spectrum は日立 RMU-6 (直接導入), 旋光度は柳本電磁式直読旋光計 OR-20, 放射能は Gas Flow Counter FC-1E, 2394, Aloka super model TPC-6 型 (1350 V, 計数効率 50%) で測定.

PPC 東洋汙紙 No. 50, 室温上昇法, 展開溶媒 1: BtOH: HOAc: H₂O=4:1:1, 溶媒 2: *n*-AmOH: 5M ギ酸=1:1.

薄層クロマトグラフ (TLC) ワコーゲル, 室温上昇法, 展開溶媒: トルエン: 酢酸エチル=3:2.

DHA H. von Euler の方法²¹⁾ に準じて AAH₂ をパラキノンで酸化して水溶液のまま用いる.

Ip-AAH₂ L. von Vargha の方法²²⁾ で合成, アセトンで再結晶して用いる. mp 220—221°.

AAH₂-Amine, Ip-AAH₂-Amine, DHA-Amine 各反応液の調製 1) AAH₂, Ip-AAH₂ はそれぞれ 3.5 g, 4.3 g (2×10⁻² mole) を 99% エタノール 100 ml に加温溶解. アミン 4×10⁻² mole を加えて室温に放置, 反応させる.

2) DHA 3.5 g (2×10⁻² mole) の 50 ml 水溶液にアミン 4×10⁻² mole を含む 99% エタノール 50 ml を加えて室温放置, 反応させる. (pH=5.2—5.4).

2-Deoxy-2-arylamino-L-ascorbic Acid の Arylamine 塩 (I) AAH₂-Amine 反応液から析出. アルコールで再結晶. 水溶液は酸性を呈し, 酸性で Tillmann 試薬を還元する. FeCl₃ 反応 (赤色). アルコール水溶液は冷時淡黄色, 温時青緑色を呈す. 熱水, アルコール可溶, アセトン, 酢酸エチル, ベンゼン不溶.

1) **I_{PA}**——淡黄色板状晶. mp 168.5—169°, 収量 29%. $[\alpha]_D^{25} = +13.4^\circ$ ($c=0.1$, EtOH). *Anal.* Calcd. C₂₀H₂₄O₇N₂: C, 59.40; H, 5.98; N, 6.93. Found: C, 59.73; H, 6.03; N, 7.29. IR $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$ cm⁻¹: 3360 (OH), 3300 (NH), 3000 (NH₃⁺) (broad), 1740 (CO). UV $\lambda_{\max}^{\text{EtOH}}$ mμ (log ε): 239 (4.34), 300 (3.82). アセチル化: 500 mg を無水酢酸, ピリジンでアセチル化して N-acetyl-*p*-anisidine を得. mp 125—127°. 収量 0.15 g. 標品と混融して融点降下せず, IR spectrum も一致. オサゾンの生成: 50 mg を 2,4-DNPH (H₂SO₄-EtOH 溶液) と反応させると, DHA-2,3-bis(2,4-dinitrophenylhydrazon) を得. 収量 55 mg. mp 284—285° *Anal.* Calcd. C₁₈H₁₄O₁₂N₈: C, 40.42; H, 2.64; N, 20.96. Found: C, 38.98; H, 2.78; N, 20.63. $[\alpha]_D^{25} = +57^\circ$ ($c=0.1$, tetrahydrofurane). DHA から合成した標品と混融, 融点降下を認めず, IR spectrum も一致. PA との反応 (褐変活性): 0.4 g を PA 0.1 g と ethanol 溶液中, 室温で 2 週間または, 70—80° で 2 時間, 水浴上で加温, 反応させると褐変, 沈殿を析出する. この沈殿は II_{PA} であることを混融, IR により確認. 収量 15 mg.

2) **I_{PP}**——淡黄白色針状晶. mp 169—169.5°. $[\alpha]_D^{25} = +36^\circ$ ($c=0.1$, EtOH). *Anal.* Calcd. C₂₂H₂₈O₇N₂: C, 61.10; H, 6.53; N, 6.48. Found: C, 61.49; H, 6.61; N, 6.48. IR $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$ cm⁻¹: 3370 (OH), 3300 (NH), 3000 (NH₃⁺), (broad), 1710 (CO). UV $\lambda_{\max}^{\text{EtOH}}$ mμ: 240, 300.

N,N'-Di-aryl or arkyloxamide (II) (Table VI) いずれも標品と混融, IR spectrum により確認.

2,3-Dehydroxy-2,3-diarylamino-L-ascorbic Acid (III) AAH₂-アミン反応液から析出. 酢酸エチルから再結晶. 淡黄白色針状晶. メタノール, エタノール, 酢酸エチル, ジオキサン可溶, 水, ベンゼン不溶.

1) **III_{PA}**——mp 202—203°. 収量 10.4%, mol. wt. M⁺=386 (Mass Spectrum). $[\alpha]_D^{25} = -10.4^\circ$ ($c=0.1$, EtOH). IR $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$ cm⁻¹: 3360, 3300, 1715 (CO), 1622. UV $\lambda_{\max}^{\text{EtOH}}$ mμ (log ε): 251 (4.14), 3.00 (4.09). *Anal.* Calcd. C₂₀H₂₂O₆N₂: C, 62.16; H, 5.74; N, 7.25. Found: C, 62.13; H, 5.77; N, 7.09.

2) **III_{PP}**——mp 212—213°. $[\alpha]_D^{25} = -120^\circ$ ($c=0.05$, EtOH). mol. wt. M⁺=414 (Mass Spectrum). *Anal.* Calcd. C₂₂H₂₆O₆N₂: C, 63.75; H, 6.32; N, 6.76. Found: C, 63.44; H, 6.40; N, 6.67. IR $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$ cm⁻¹: 1715, 1630.

3) **III_{PT}**——mp 214—215° 収量 15.3%. $[\alpha]_D^{25} = -77.0^\circ$ ($c=0.1$, dimethylformamide) mol. wt. M⁺=354 (Mass Spectrum). *Anal.* Calcd. C₂₀H₂₂O₄N₂: C, 67.78; H, 6.26; N, 7.91. Found: 68.06; H, 6.39; N, 7.83. IR $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$ cm⁻¹: 1715, 1624. UV $\lambda_{\max}^{\text{EtOH}}$ mμ (log ε): 252 (4.48), 290 (4.41).

III_{PT} のアセチル化 1) **III_{PT}**——0.5 g をピリジン, 無水酢酸でアセチル化すると, アセトン難溶物と可溶物ができる. 前者は II_{PT} である. 収量 20 mg, 後者は TLC により精製. (*R_f*: 0.51). mp 135.5—137°. 白色粉末の diacetate を得. 収量 0.51 g. *Anal.* Calcd. C₂₄H₂₆O₆N₂: C, 65.74; H, 5.98; N, 6.39. Found: C, 65.40; H, 6.06; N, 6.13. IR $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$ cm⁻¹: 1752 (COCH₃), 1730 (CO), 1615, OH 吸収消失.

2) **III_{PT}**——0.5 g を無水酢酸ナトリウム, 無水酢酸でアセチル化すると, 同じく II_{PT} 125 mg diacetate 0.1 g を得. なお acetate は空气中で不安定で徐々に分解, 青緑色を帯び, II_{PT} とタール状物質を与える.

III_{PT} のイソプロピリデン化 **III_{PT}** 0.5 g を無水アセトン 30 ml に懸濁し, 氷冷下 c. H₂SO₄ 0.6 ml を滴下, 室温で 4 時間反応, 反応後氷水中に注ぎ, 析出する帯黄白色沈殿を採取, 水洗, 風乾したのち少量のアセトンで不溶物と可溶物に分ける. 前者は II_{PT} であり, 収量 10 mg, 後者は TLC で精製 (*R_f*: 0.36). イソプロピリデン体を得. mp 186—188° 収量 0.21 g. *Anal.* Calcd. C₂₃H₂₆O₄N₂: C, 70.03; H, 6.64; N, 7.10. Found: C, 69.82; H,

20) 融点は未補正.

21) H. von Euler, *Arkiv. Kemi.*, **8**, 67 (1955).

22) L. von Vargha, *Nature*, **130**, 848 (1932); **131**, 363 (1933).

6.68; N, 7.20. IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 1715 (CO), 1615, OH 吸収消失. なおイソプロピリデン体はアセテートと同様. 着色分解し II_{PT} とタール状物質を与える.

III_{PT} の酸化分解 1) アンモニアアルカリ性 H_2O_2 分解——III_{PT} 0.30 g をメタノール 15 ml に加温溶解. これに 28% アンモニア水 3 ml を加え, 60° に保ち攪拌下 30% H_2O_2 3 ml 滴下. 滴下後さらに 1 時間反応させ冷後析出物ヲ取, 析出物は II_{PT} と同定. 収量 82 mg. 母液は濃縮, 残留物をベンゼン-酢酸エチルから再結晶. 白色針状晶. mp 166—167° 収量 115 mg. $[\alpha]_D^{25} = +58^\circ$ ($c=0.1$, EtOH). Anal. Calcd. $\text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{O}_4\text{N}$: C, 58.65; H, 6.71; N, 6.22. Found: C, 58.35; H, 6.74; N, 6.51. IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 1640 (CONH). 神谷の方法⁹⁾ で合成した L-threonic acid に PT を反応させて得た標品と混融, 融点降下せず, IR spectrum も完全に一致.

2) NaIO_4 酸化——a) II_{PT} の生成, III_{PT} 35.4 mg を dimethylformamide 15 ml に溶解. 5—10°C で 0.2M NaIO_4 溶液 2 ml を加えて一定時間反応させる. 反応後過剰の NaIO_4 をエチレングリコールを加えて分解. 水 200 ml を加え析出白色沈殿 II_{PT} (混融, IR により確認) を取. 収量 (反応時間); 15.6 mg (57.9%) (15 分), 16.5 mg (60.8%) (30 分), 22.0 mg (82.1%) (24 hr). b) 生成するホルムアルデヒドの定量. W.R. Frisell らの方法²³⁾ を応用してクロモトロープ酸による吸光度を測定してホルムアルデヒド量を算出. III_{PT} 1 mole あたり 0.87 mole のホルムアルデヒドの生成を認めた.

N,N'-Di-*p*-tolyl mesoxalamide Hydrate (IV) Chart 1 により分離. 希酢酸から再結晶. 白色針状晶. mp 185—186° (110—120° で黄変).²⁴⁾ Anal. Calcd. $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{O}_4\text{N}_2$: C, 64.95; N, 5.77; N, 8.91. Found: C, 64.72; H, 5.81; N, 8.96. IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 3390 (OH), 3300 (NH), 1678 (CONH). N,N'-Di-*p*-tolyl-di-bromo-malonamide から別途合成した標品と混融, 融点降下せず, IR spectrum も一致.

N-*p*-Tolyl-oxamic Acid (V_{PT}) Chart 1 から分離. ベンゼンから再結晶. 無色針状晶. mp 168°. Anal. Calcd. $\text{C}_9\text{H}_9\text{O}_3\text{N}$: C, 60.33; H, 5.06; N, 7.82. Found: C, 60.38; H, 5.15; N, 7.84. IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 3320, 3240, 1760, 1680. 本品を 20% HCl で加水分解. シュウ酸 (mp 99—101°) の生成を確認.

Azotoluene (VI_{PT}) Chart 1 により分離. リグロインから再結晶. 橙色プリズム晶. mp 142—144° Azotoluene 標品と混融, 融点降下を認めず. IR spectrum も一致.

水溶性画分 (Chart 1, C) の検討 水溶性画分につき PPC で酸性物質を検討, glyceric acid (R_f : 0.35, 溶媒 1) (R_f : 0.21, 溶媒 2), L-threonic acid (R_f : 0.23, 溶媒 1) に一致するスポットを認めた. シュウ酸に対応するスポットは認められなかった.

1) Glyceric Acid——標品は glycerol の硝酸酸化²⁵⁾ により調製. R_f : 0.35 のスポットを切り取り, メタノール抽出. 濃縮, 残留シロップに CaCO_3 を加え結晶化, mp 137°. これは標品から調製した Ca 塩と混融し, 融点降下を認めず.

2) L-Threonic Acid——標品は神谷らの方法⁹⁾ に従い AAH_2 の H_2O_2 分解によって調製. R_f : 0.23 のスポットを切り取り水で抽出, 濃縮, 残留シロップにブルシンを加えて結晶化, mp 206—207° これは標品のブルシン塩と混融, 融点降下せず.

$\text{AAH}_2\text{-}^{14}\text{C}_1$ の分解で生成する II_{PT} の由来 $\text{AAH}_2\text{-}^{14}\text{C}_1$ 1.7612 g (比放射能 1.460×10^6 cpm/mmmole). PA 2.46 g をエタノール 60 ml に溶解. 生成する II_{PA} を取. ジオキサンから再結晶. 測定に用いる, II_{PA} 3.04 mg の比放射能, 12182 cpm を得. 比放射能は 1.205×10^6 cpm/mmmole で, $\text{AAH}_2\text{-}^{14}\text{C}_1$ の ^{14}C は II_{PA} 中に 82.5 % で検出された.

謝辞 終りに, 元素分析を担当された本学中央分析室, 成田九州男氏他, UV 測定を担当された豊田孝子嬢, Mass Spectrum を測定していただいた内田三夫氏, 日立製作所那珂工場の各位に謝意を表します.

23) W.R. Frisell, L. A. Meech, C.G. Mackenzie, *J. Biol. Chem.*, **207**, 709 (1954).

24) *Beilstein*, **12**, 972, mp 187°.

25) *Beilstein*, **3**, 395.