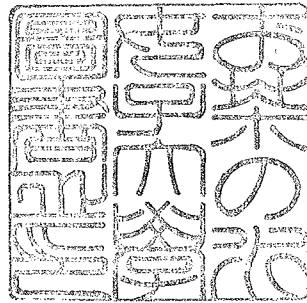


3775
015
69

29

博士学位論文

アスコルビン酸の自動酸化機構



お茶の水女子大学大学院 人間文化研究科
人間環境学専攻

三宅紀子

Autoxidation mechanism of L-ascorbic acid

Noriko Miyake

L-Ascorbic acid (ASA) plays various important roles in food and biological systems. Most of these roles are due to the redox-system which consists of ASA, monodehydro-ASA (MDASA), and dehydro-ASA(DASA). Also, it is generally accepted that ASA is an important antioxidant in both food and biological systems. However the reaction mechanisms by which ASA acts as an antioxidant have not been fully clarified yet. When ASA acts as an antioxidant, the oxidation reaction of ASA necessarily occurs to yield MDASA and DASA. Oxygen is one of most popular oxidants exists in food and biological systems, and the reaction of ASA with oxygen, the autoxidation of ASA, is known to occur in foods very frequently, and also in biological systems. Therefore, it is important to elucidate the autoxidation reaction mechanism to obtain the fundamental information necessary to understand the characteristic and important function of ASA in food and biological systems.

Because ASA is water soluble, it has always been believed that it exists only in hydrophilic regions of foods or biological tissues, and that ASA participates exclusively in the reactions occurring in hydrophilic region. However, food and biological systems usually have many constituents, and are essentially composed of multi-phase and multi-component. Therefore, in food and biological systems, there might be regions which have intermediate dielectric constant, between *ca.*80, the dielectric constant of water, and *ca.*2, those of hydrocarbons. Indeed, it was reported that ASA could reduce tocopherol radical existing in hydrophobic region. Since ASA might play some roles in the reactions occurring in more hydrophobic

region than water, it is important to evaluate the chemical behavior of ASA in non-aqueous solvent of lower dielectric constant than that of water.

It is well known that ASA is a scavenger of active oxygen species, such as superoxide anion(O_2^-), hydroxyl radical, and singlet oxygen. It was also reported that O_2^- was formed during the autoxidation reaction of ASA in aqueous solution in both absence and presence of metal ion catalysts, but the formation mechanism of O_2^- has not been fully elucidated.

It has long been believed that ASA is degraded via MDASA, DASA, and 2,3-diketo-L-gulonic acid (DKG). Many oxidation products besides lyxonic acid and xylonic acid, typical decarboxylation products from DKG, were reported, and all of them were considered to be formed via DASA and DKG. On the other hand, Kwon *et al.* reported that L-threonolactone (THL) and oxalic acid (OXA) were formed in the photooxygenation of ASA, the oxidation reaction of ASA with singlet oxygen, *via* the C(2) oxygen adduct of ASA (=hydroperoxy-DASA), and not *via* DASA, and they proposed that THL and OXA were produced, as the C(2)-C(3) fission products, from the C(2) oxygen adduct of ASA.

It is known that the oxidation reaction of ASA is accelerated by heavy metal ions and the reaction rate without metal ions is very slow. However, studies on the oxidation reaction of ASA in the absence of metal ions, which is the reaction of ASA with oxygen molecule, are considered to be by all means necessary to get fundamental information on the oxidation mechanism of ASA.

The purpose of this study is to clarify the autoxidation reaction mechanism of ASA. In this study, to elucidate the autoxidation mechanism of ASA in both aqueous and non-aqueous solution, the autoxidation reaction products of ASA were separated and identified,

and based on the results, the reaction mechanism was discussed.

Oxidation rates of ASA in both aqueous and non-aqueous systems were measured. Pure water, methanol, ethanol, and acetonitrile were used as solvents, and the oxidation was carried out by introducing O₂ gas to the ASA solution at a flow rate of 200 ml/min. Effects of reaction temperature, light, and dissociation forms of ASA on the oxidation rates of ASA in methanol were examined. As the result, ASA was more unstable in non-aqueous solvent than aqueous solution because the concentration of oxygen was much higher in non-aqueous solvent than in water. The dissociated form of ASA was also more unstable in methanol.

Furthermore, effects of heavy metal ions and proteins on the autoxidation rates of ASA in aqueous solution were studied. The heavy metal ion is well known to accelerate the oxidation reaction of ASA in aqueous solution, while ASA solution is considered to be stabilized in the presence of protein, however, the reaction mechanism involved in these phenomena have not been fully clarified. When Fe(III) or Cu(II) was added to the reaction mixture, the oxidation rates of ASA in both water and methanol and the catalytic activity of these metals in both aqueous solution and methanol were evaluated. The reaction in aqueous solution was catalyzed more greatly by Cu(II), while catalytic effect of Fe(III) was greater in the reaction in methanol. It was reported that superoxide dismutase (SOD) stabilizes ASA in aqueous solution because of scavenging O₂⁻ formed during the autoxidation reaction of ASA. In this study, the effects of SOD, catalase, and non-enzyme proteins such as BSA, γ -globulin on the autoxidation reaction of ASA were examined. The stabilizing effects of SOD and these proteins on the stability of ASA

were observed. Effect of enzymatic O_2^- scavenging ability of SOD on the stabilization of ASA was reconfirmed, however, effect of enzymatic activity of catalase, removal of H_2O_2 , on the stabilization of ASA was not observed. Although the exact mechanism of the O_2^- scavenging process was not fully clarified, the non-enzymatic O_2^- scavenging ability of these proteins considerably affected the stabilization of ASA. Some interaction of ASA with protein might be involved in the stabilization of ASA.

Separation and identification of autoxidation products of ASA in methanol were carried out. THL and OXA other than DASA, were identified by GC and GC-MS analysis. These results showed that the autoxidation products of ASA coincided with the reaction products of ASA with singlet oxygen. In this study, it was also confirmed that they were not formed from DASA under these reaction conditions. These products were also detected in the autoxidation reaction of ASA monoanion, the dissociated form of ASA, in methanol and in the autoxidation reaction of ASA in water, too. Therefore this reaction probably occurs in both various foods and biological systems. The autoxidation reaction of ASA was suggested to proceed *via* the formation of C(2) oxygen adduct of ASA.

Yield of THL was measured under various experimental conditions. THL was also detected in the oxidation reaction of ASA in both water and methanol in the presence of Fe(III) or Cu(II), although their yield of THL was lower than in the reaction without metal ion, with the exception of the reaction in methanol with Fe(III). Therefore this THL producing reaction might be operative even in the presence of metal ion. In the oxidation reaction of ASA monoanion in methanol, besides THL formation of threonic acid and threonic methyl ester were confirmed, and the yield of THL was lower than in the case of non-

dissociated ASA. Threonic acid and threonic methyl ester were also considered to be C(2)-C(3) fission products of C(2) oxygen adduct of ASA.

Yield of oxidation products and remaining ratio of ASA in the oxidation of ASA in methanol were measured. The equimolar production of THL and OXA was confirmed which unequivocally showed C(2)-C(3) bond cleavage to occur. Although yield of THL (OXA) was one twelveths of yield of DASA, these products were considered to be important as degradation products of ASA, because the easy reversible reduction of DASA to ASA usually occurs in biological systems, and thus the concentration of DASA in normal biological tissues were maintained at rather low levels.

Together with all these experimental approaches, the autoxidation reaction mechanism in the absence of metal ion catalysts was also investigated by using the PM3 method in MOPAC, a semi-empirical molecular orbital (MO) method. It was shown that the yield of THL in the oxidation of ASA in D₂O, where singlet oxygen was more stable, was significantly larger than that observed in H₂O. The calculation on the super-molecule of ASA (anion) with oxygen molecule was done using the PM3 method. In the vicinity of ASA anion, the energy needed for the conversion of triplet oxygen to singlet one was considerably lowered, and thus, formation of C(2) oxygen adduct of ASA was strongly suggested. Possible involvement of singlet oxygen in this autoxidation process was suggested from the results of experiment and MO calculation. Formation of O₂⁻ in the autoxidation process of ASA in aqueous solution was confirmed, and it was also detected in methanol solution. From the results of MO calculation, O₂⁻ might be produced by direct release from C(2) oxygen adduct of ASA.

All these facts suggested the following reaction mechanism for the

autoxidation of ASA. In the autoxidation reaction of ASA, when oxygen molecule approached very closely to ASA, triplet oxygen came to behave like singlet oxygen, and C(2) oxygen adduct of ASA would be formed, where two pathways were derived, 1) O_2^- was formed generating MDASA which resulted in DASA and ASA by disproportionation, 2) without the release of O_2^- , C(2)-C(3) fission products, such as THL and OXA would be formed. The reaction pathway of ASA monoanion might be a little different from that of non-dissociated ASA, because there might be some difference in the formation of bicyclic structure of the oxygen adduct.

Finally, the autoxidation mechanism of ASA related compounds, such as D-*arabo*-ascorbic acid (=erythorbic acid ; ERA) and triose reductone (TR) was studied. ERA is an epimer of ASA, and TR is the most simple "aci-reductone", which has the same functional groups -CO-C(OH)=C(OH)- as ASA. The formation of C(2)-C(3) fission products, erythronolactone and OXA, glyoxylic acid and formic acid were confirmed as the oxidation products of ERA and TR in methanol, respectively. O_2^- was formed during both the autoxidation of ERA and that of TR in methanol. From the results of MO calculation, the formation of C(2) oxygen adduct was also suggested as intermediate product during both the autoxidation of ERA and that of TR. The oxidation reaction of these ASA related compounds would proceed by the similar reaction mechanism as that of ASA.

In this study, I proposed a new autoxidation pathway of ASA, which was different from the long believed "*via* DASA" autoxidation pathway of ASA and could be operative in both various foods and biological systems. It is noteworthy that this new oxidation pathway

proceed via C(2) oxygen adduct of ASA. From the view point of antioxidant mechanism, this pathway has two roles. The process leading to the production of O_2^- is considered to be somehow related to the pro-oxidant effect, while that yielding C(2)-C(3) fission products, non-radical products would be related to the antioxidant effect of ASA with the consumption of O_2 which is the most popular and powerful oxidant observed in food and biological systems. These basic findings might contribute to the understanding of the behavior and various roles of ASA in food and biological systems.

略語一覽

ASA	: L-ascorbic acid
DASA	: dehydro-L-ascorbic acid
MDASA	: monodehydro-L-ascorbic acid
DKG	: 2,3-diketo-L-gulonic acid
THL	: L-threonolactone
OXA	: oxalic acid
ERA	: D- <i>arabo</i> -ascorbic acid (=D-isoascorbic acid, erythorbic acid)
DERA	: dehydro-D- <i>arabo</i> -ascorbic acid (=dehydro-D-erythorbic acid)
ERL	: D-erythrololactone
TR	: triose reductone
DR	: dehydro-triose reductone
SOD	: superoxide dismutase
CAT	: catalase
TMS	: trimethylsilyl
LUMO	: lowest unoccupied molecular orbital
HOMO	: highest occupied molecular orbital
UHF	: unrestricted Hartree-Fock
RHF	: restricted Hartree-Fock

目次

第I章 序論

1.1	はじめに	1
1.2	食品・生体系におけるアスコルビン酸の存在領域	2
1.3	アスコルビン酸の自動酸化反応	3
1.4	アスコルビン酸の酸化的分解経路	5
1.5	活性酸素・フリーラジカルの産生と消去機構	8
1.6	アスコルビン酸と活性酸素・フリーラジカル	9
1.7	本研究の意義と目的	12

第II章 種々の条件下でのアスコルビン酸の分解

2.1	目的	15
2.2	実験材料と方法	18
2.2.1	アスコルビン酸の自動酸化反応	18
2.2.2	アスコルビン酸の残存率の測定	21
2.2.3	分子軌道法の計算方法	23
2.3	結果及び考察	24
2.3.1	溶媒の種類	24
2.3.2	アスコルビン酸初濃度の影響	26
2.3.3	温度及び光の影響	28
2.3.4	アスコルビン酸の溶液中での存在形態の影響	30
2.3.5	金属触媒共存の影響	32
2.3.6	タンパク質共存の影響	35
2.3.6.1	活性酸素消去酵素	35
2.3.6.2	非酵素タンパク質	42

第III章 アスコルビン酸の自動酸化生成物

3.1	目的	46
3.2	実験材料と方法	48
3.2.1	アスコルビン酸の自動酸化反応	48
3.2.2	アスコルビン酸の酸化生成物の分離・同定	48
3.2.3	デヒドロアスコルビン酸及びジケトグルン酸の酸化生成物の分離・同定	51
3.2.4	アスコルビン酸の残存率の測定	51
3.2.5	アスコルビン酸の酸化生成物の定量	51
3.3	結果及び考察	55
3.3.1	金属触媒非存在下でのアスコルビン酸の酸化反応生成物	55
3.3.1.1	メタノール中及び水中におけるアスコルビン酸の酸化反応生成物	55

3.3.1.2	デヒドロアスコルビン酸及びジケトグルン酸の酸化反応におけるスレオノラクトン及びシュウ酸の生成	60
3.3.1.3	メタノール中におけるアスコルビン酸酸化生成物の化学量論的關係	61
3.3.2	種々の条件下でのスレオノラクトンの収率	63
3.3.2.1	溶媒の種類の影響	63
3.3.2.2	アスコルビン酸初濃度の影響	65
3.3.2.3	温度及び光の影響	67
3.3.2.4	アスコルビン酸の溶液中での存在形態の影響	69
3.3.2.5	金属触媒の影響	77

第IV章 アスコルビン酸の自動酸化反応機構

4.1	目的	82
4.2	実験材料と方法	82
4.2.1	アスコルビン酸の自動酸化反応への一重項酸素の関与の可能性	84
4.2.2	アスコルビン酸の酸化反応における O_2^- の検出実験	84
4.3	結果及び考察	86
4.3.1	アスコルビン酸の酸化反応における一重項酸素の関与の可能性	86
4.3.1.1	分子軌道法による検討	86
4.3.1.2	重水を用いた実験による検討	91
4.3.2	アスコルビン酸の酸化反応における O_2^- の生成	93
4.3.2.1	水溶液中での反応	93
4.3.2.2	メタノール中での反応	95
4.3.2.3	分子軌道法による検討	101
4.3.3	アスコルビン酸の自動酸化反応機構	103

第V章 アスコルビン酸関連化合物の自動酸化反応機構

5.1	目的	110
5.2	実験材料と方法	112
5.2.1	エリソルビン酸、トリオースレダクトンの自動酸化反応	112
5.2.2	エリソルビン酸、トリオースレダクトンの残存率の測定	113
5.2.3	サイクリックボルタンメトリー	114
5.2.4	エリソルビン酸、トリオースレダクトンの酸化生成物の分離・同定	114
5.2.5	エリソルビン酸の酸化生成物の定量	115
5.2.6	エリソルビン酸、トリオースレダクトンのメタノール中での酸化反応における O_2^- の検出実験	115
5.2.7	分子軌道法の計算方法	116
5.2.8	検定法	116

5.3	結果及び考察	117
5.3.1	エリソルビン酸のメタノール中での自動酸化反応	117
5.3.1.1	エリソルビン酸の酸化分解率	117
5.3.1.2	エリソルビン酸の酸化反応生成物	121
5.3.1.3	エリソルビン酸の酸化反応における化学量論	124
5.3.1.4	エリソルビン酸の酸化反応における O_2^- の生成	126
5.3.1.5	エリソルビン酸の酸化反応についての分子軌道法による 検討	127
5.3.1.6	エリソルビン酸の自動酸化反応機構	130
5.3.2	トリオースレダクトンの自動酸化反応	132
5.3.2.1	トリオースレダクトンの酸化分解反応	132
5.3.2.2	トリオースレダクトンの酸化反応生成物	137
5.3.2.3	トリオースレダクトンの酸化反応における O_2^- の生成	139
5.3.2.4	トリオースレダクトンの酸化反応についての分子軌道法 による検討	140
5.3.2.5	トリオースレダクトンの自動酸化反応機構	142
第VI章	総括	143
	参考文献	149
	謝辞	

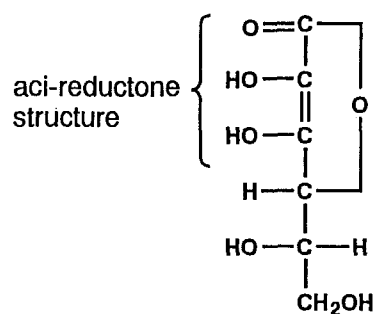
第 I 章 序論

1.1 はじめに

L-アスコルビン酸(L-ascorbic acid、ASA)、すなわちビタミンCは、抗壊血病因子として発見され、その合成能のない人間にとっては食物からの摂取が必須な水溶性微量栄養素である。その生理機能としてはコラーゲンの生合成におけるプロリン[1]及びリジン[2]残基の水酸化、チロシンの代謝[3]及びカテコールアミンの生合成[4]、コレステロール代謝[5]、生体異物の解毒[6]など主として水酸化反応への関与が挙げられるが、その他、鉄の吸収[7]や免疫機能の賦活化[8]などへの寄与も知られている。さらに、近年注目されてきている活性酸素やフリーラジカルによる生体の酸化傷害を防御する抗酸化物質としても重要な役割を果たしていること[9-12]が明らかになってきている。また、ASAは野菜、果物などに本来含まれているだけでなく、食品添加物として、果汁などの変色防止や抗酸化などの目的で添加・使用されているが、それ以外にも、パン・蒲鉾などの物性改良なども含め、多くの食品加工プロセスに広く用いられている。しかしながら、ASAの食品及び生体系における挙動やその反応機構などの詳細については十分に解明されているとは言い難く未だ不明な点が多く残されている。

さて、ASAは1928年にSzent-Györgyi[13]により初めて、強い還元性を有する物質としてウシの副腎から結晶として分離された。最初は炭素数6の酸性を示す糖関連化合物という意味で、ヘキサロン酸として命名されたが、1932年にKingら[14]によりこの物質がビタミンCそのものであることが確認され、1933年にHaworthら[15]によりその構造式が決定され、抗壊血病(*antiscorbutic*)という意味をこめてアスコルビン酸(*ascorbic acid*)と呼ばれるようになった。

ASAの構造式をFig. 1-1に示す。ASAは $C_6H_8O_6$ の組成式を有し、平面的な



**L-ascorbic acid
(ASA)**

(2,3-didehydro-L-threo-hexono-1,4-lactone)

Fig. 1-1 Structure of L-Ascorbic acid

ラクトン環に組み込まれたカルボニル基と共役したエンジオール基、すなわち $-\text{C}(\text{OH})=\text{C}(\text{OH})-\text{CO}-$ という部分構造を有し、強い還元性を示す。この部分構造はvon Euler[16]がその後、一連のレダクトンの研究の発端となったトリオースレダクトン($\text{CH}(\text{OH})=\text{C}(\text{OH})-\text{CHO}$)とその化学的性質が類似していることからASAが共通の部分構造を有するのではないかと推定した構造であり、いずれもレダクトンの中でも、酸性溶液中においても還元性を示すaci-reductone[17]として分類されている。前述したようなASAが食品・生体系における多様な機能を果たす際の最も重要なASAの化学的性質がこの還元性、すなわち電子供与性である。

1.2 食品・生体系におけるアスコルビン酸の存在領域

ASAは水溶性の化合物であり、油脂には全く溶解しないため、食品及び生体系において水系のみに存在すると考えられている。従って、ASAの食品・生体系における化学的挙動の解析等に関しても、この溶解性の問題もあるため、従来水溶液中での挙動についてのみ研究されており、非水系については、銅イオン存在下、アセトニトリル-水混合系におけるASAの還元性についての報告[18]があるくらいでほとんど研究が

なされてきていない。しかしながら、ASAの抗酸化性については、細胞膜内外の水相に存在するASAが、脂溶性化合物であり生体膜中に存在するトコフェロール(ビタミンE)と相補的に作用して生体膜中の脂質酸化を阻止することがよく知られている[19-24]。このビタミンEとの相乗的な抗酸化作用についてはシステインなどの生体内SH化合物によっても行われることが知られているが、その効果はASAの方が優れているといわれている[25]。この反応機構についてはNikiら[19, 26, 27]は生体膜モデル系を用いてASAがビタミンEラジカルを再生することを報告し、この反応が膜表面で起こるものと推定しているが、その詳細は十分には解明されていない。一方、食品及び生体系には従来よく知られている典型的な親水性領域及び疎水性領域の他に、両者の境界領域に相当するそれらの中間ともいべき領域、すなわち両者の混ざり合った領域が存在するはずである。そしてこの領域は両者の中間の誘電率を示すと考えられる。従って、ASAは親水性領域のみならず、この中間領域にもある程度存在すると考えられ、生体膜においても疎水性化合物との相互作用はこの中間の誘電率を示す領域で起きている可能性が考えられる。以上のことから、水溶液中のみならず、より疎水的な環境下でのASAの挙動についての情報を得ることも、ASAの食品及び生体系での作用機構を明らかにする上で重要であると考えられる。

1.3 アスコルビン酸の自動酸化反応

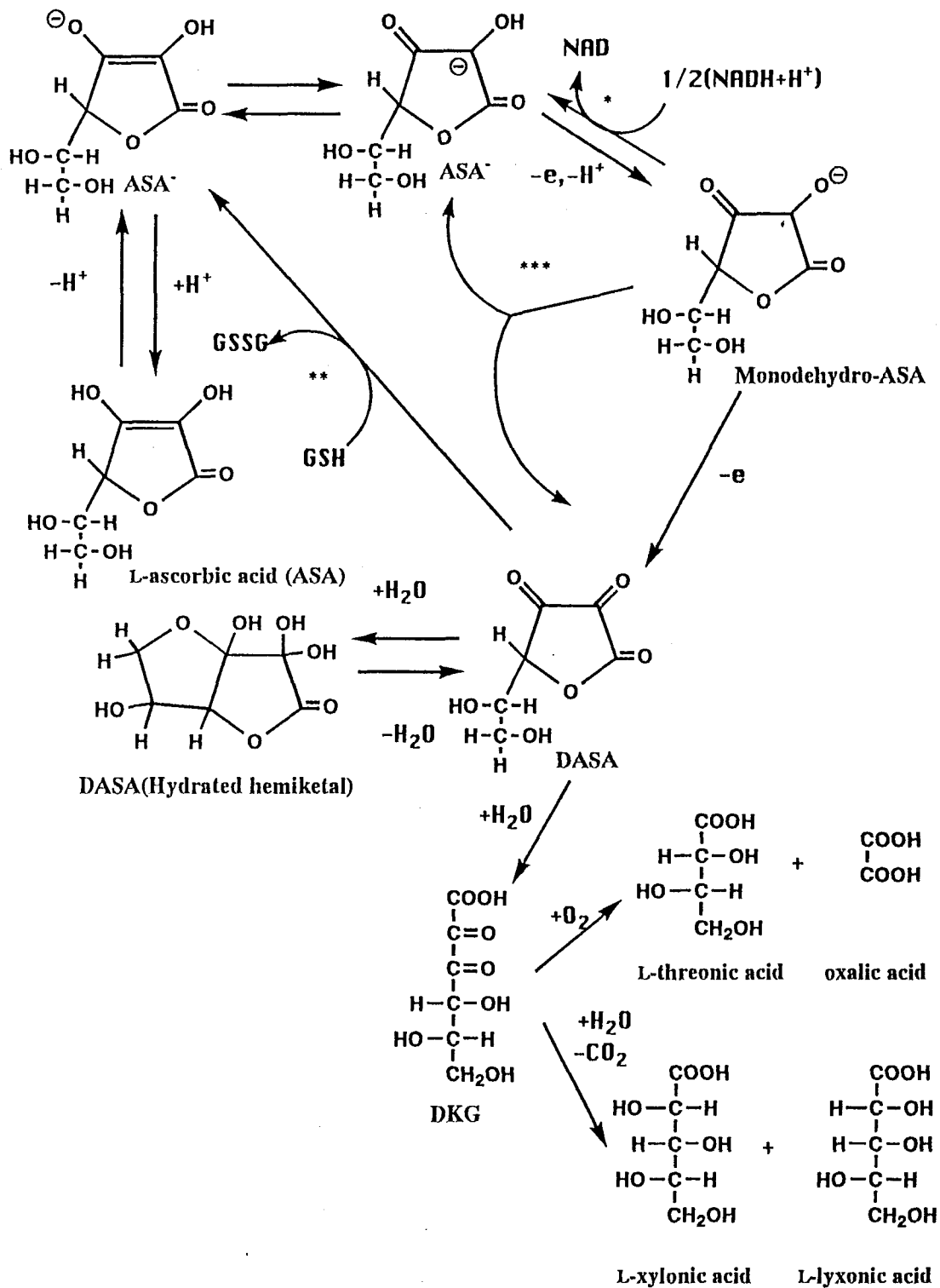
ASAの酸化的分解に関する動力学的な研究は1960年代からモデル系を用いて多くなされてきている。たとえば、緩衝液中でのASAの酸化速度に及ぼすpHの影響について、Finholtら[28](1963)、梶田[29](1964)、Rogersら[30](1971)、Blangら[31](1972)、安茂ら[32](1973)等多くの報告がなされてきている。それらの研究の中ではASAの酸化分解に及ぼ

す緩衝液の種類、イオン強度、反応温度等の影響についても調べられている。また、ASAの分解速度に影響を及ぼす要因として、酸素濃度[32]、水分活性[33]、凍結[34]、アミノ酸[29, 35]、糖類[36-38]、還元剤[39]などについても報告されているが、その作用機構の詳細については未だ十分解明されていない。このASAの酸化速度に最も大きな影響を及ぼすものとして遷移金属イオンが挙げられ、これについても数多くの研究がなされている[40-45]。銅イオンや鉄イオン等の遷移金属イオンはASAの酸化反応において触媒として作用することが示されており、その反応の際、ASAと金属イオンと酸素分子の3者間で錯体を形成して電子の移動が起こると考えられているが、その反応機構の詳細も明らかになっていない。また、金属触媒存在下においてはこの金属イオンをキレートする金属封鎖剤やリン酸、クエン酸などを反応系に共存させることによってASAの安定化をはかることができることがわかっている[49]。しかし、その一方で、EDTA鉄などのようにキレート化合物自身がASAの酸化分解の触媒作用を示すこともよく知られている[47, 48]。最近になって緩衝液中でのASAの酸化反応も、緩衝液中の微量重金属イオンを除去するとその反応速度は極めて低いことが報告されている[49]。一方、金属触媒非存在下ではASAの自動酸化反応、すなわちASA分子と酸素分子との直接的な反応性は大変低いといわれている。これはASA分子と酸素分子との反応が一重項の分子と三重項の分子との反応であるため、両者はスピン禁制則により、通常本質的に反応しがたいことから説明できる[45]。ただし、このように反応速度は極めて低いですが、金属触媒非存在下でのASAの自動酸化反応は、ASAの酸化反応における最も基礎的な反応系であると考えられ、ASAの酸化反応を解析する上で非常に重要であると思われる。しかし、残念ながら反応機構の詳細、特にASAからの電子授受機構については十分に解析が行われてきていない。

1.4 アスコルビン酸の酸化分解経路

ASAが食品及び生体系において多様な機能を果たしていく際に、必然的にASA自身はその反応過程で変化することになる。従って、このASAの変化過程や、その結果生じてくる反応中間体及び分解生成物についての情報を得ることは食品・生体系におけるASAの挙動を知る上で重要であると考えられる。たとえば、ASAの主要な働きのひとつと考えられる抗酸化作用についても、その機能を果たす際にASA自身は必然的に酸化を受けることとなる。

ASAの酸化分解経路としては従来、次のような経路がよく知られている (Scheme1-1参照)。すなわち、ASAはその電子供与過程においてモノデヒドロASA (MDASA) に一電子酸化される。MDASAはNADHを特異電子供与体とするMDASAレダクターゼ (EC 1.6.5.4) によりASAに還元されるか、あるいは不均化反応により2分子のMDASAから等モルのASAとデヒドロASA (DASA) に変化する [39, 50]。MDASAからさらにもう一電子酸化によりあるいは不均化反応により生成したDASAは酵素的に、あるいは反応系に共存する還元剤 (たとえばシステイン、還元型グルタチオン:GSHなど) により非酵素的に、ASAに還元される [51]。その際作用する酵素はDASAレダクターゼ (EC 1.8.5.1) で、特異的な電子供与体はGSHであることが知られている [52]。これらMDASA及びDASAを還元する酵素については植物については詳しく研究されているが、高等動物についてはこれらの酵素活性を示すものは動物の組織から確認されているものの、未だ不明な点が多い。最近ラットにおいてMDASAレダクターゼ及びDASAレダクターゼと同様の酵素活性を示す物質についていくつか報告がなされている [53-56]。一方、DASAはその2位のカルボニル基が水和して、bicyclicな構造をとることが知られており、さらにはかなり不安定であるため、水溶液中では容易に加水分解してラクトン環を開環して2,3-ジケ



* : Monodehydro-AsA reductase ** : DASA reductase *** : Disproportionation

Scheme 1-1 Oxidation pathway of L-ascorbic acid

ト-L-グロン酸(DKG)を生じる[51]。この加水分解反応は酵素的にも起こることがわかっており、DASA加水分解酵素はKagawaら[57, 58]によりアルドノラクトナーゼと同一であること、動物に広く分布するがその活性は霊長類においては他の動物に比較して著しく低いことが報告されている。DKGの分解経路としては1位の炭素が脱炭酸され、L-リキソン酸とL-キシロン酸が生成する経路と酸化されシュウ酸(OXA)とスレオン酸が生成する経路が最もよく知られている。前者の脱炭酸経路は酵素的にも非酵素的にも起こることがわかっており、DKG脱炭酸酵素も分離・精製されている[59-61]。後者の反応経路は中性及びアルカリ性で非酵素的に起こると考えられており、生体内の条件であるpH7近辺ではこの反応経路がDKGの生分解反応に寄与する割合はかなり小さいと考えられている。この他、ASAの中性溶液中での酸化的分解生成物としてはグリセリン酸[62-64]、グリオキシル酸[62-64]、スレオース[62-64]、C-(スレオ-1, 2, 3-トリヒドロキシプロピル)タルトロン酸[62]なども報告されており、いずれもDASA及びDKGを経て生成するものと推定されている。また、DKGからの反応中間体として、3, 4-エンジオール型DKG- δ -ラクトン[65]や、2, 3-エンジオール型DKG- δ -ラクトン[66]も報告されている。

しかしながら、このASAの酸化的分解経路の詳細は未だ十分解明されておらず、これら生成物の生成機構等についても不明な点が多く残されている。さらに、食品及び生体系においてはこれらの酸化反応中間体や生成物が共存するタンパク質、多糖、核酸などと反応し、重合化などを引き起こすことも知られている。たとえば、コラーゲンや水晶体からそれぞれ単離されているペントシジンやLM1などの蛍光性を有する架橋構造物質はこれらタンパク質のリジン、アルギニン等アミノ酸残基とDASA、DKGとの反応によっても生成することが報告されている[67-70]。従って、ASAの酸化的分解経路についての情報を得ることはASAの食品及び生体系

でのASAの挙動を総合的に理解する上で非常に重要であると考えられる。

1.5 活性酸素・フリーラジカルの産生と消去機構

人間なども含め、いわゆる好気性の生物は酸素をエネルギー源として利用している。細胞内で酸化剤として代謝エネルギー産生に利用された酸素は、スーパーオキシド(O_2^-)、過酸化水素(H_2O_2)、ヒドロキシラジカル($\cdot OH$)等の活性酸素を経由して、水になるが、これら活性酸素によって細胞膜の脂質、核酸、タンパク質等が傷害を受けることがフリーラジカルによる細胞傷害の主要部分を占めているものと考えられている。生体における活性酸素・フリーラジカルの生成反応としては、ミトコンドリアでのシトクロム酸化酵素による酸素の4電子還元反応の過程や、好中球、マクロファージ等におけるNADPH酸化酵素による酸素の一電子還元反応などのように通常の生理的に起きる反応がある。また、その他、フリーラジカルが各種ストレスや虚血などの病的状態において生成したり、光や紫外線などの照射により生成したり、食物や大気中の汚染物質として体外、すなわち環境から、フリーラジカル、あるいはその前駆体として直接体内に取り込まれることもある。一方で活性酸素は生体にとってプラスの作用も行っており、炎症の場合においては食細胞の産生する活性酸素は殺菌作用において重要な役割を果たしている。生体は酸素を利用する過程において多くの場合、活性酸素を生成するので、生体にはこの活性酸素を消去する防御機構も備わっている。しかしながらこの活性酸素の生成と消去のバランスが崩れたときには、この活性酸素・フリーラジカルによる細胞傷害が癌をはじめとして動脈硬化、糖尿病、白内障などの種々の病態・疾患、老化を引き起こすのである。このように人間にとって欠くことのできない酸素が本来両刃の剣としての性格を有することから、生体内過酸化現象とそれを防御する生体内抗酸化機構とが健

康の維持・増進との関連で最近非常に注目されているわけである[71-75]。

生体におけるフリーラジカルに対する防御機構としては、まず、活性酸素・フリーラジカルの産生を抑える役割を果たす予防的抗酸化物質といわれるものがある。これには H_2O_2 を分解する酵素であるカタラーゼ(CAT)やグルタチオンペルオキシダーゼなど、 O_2^- を不均化反応により消去するスーパーオキシドジスムターゼ(SOD)、一重項酸素を消去するカロテノイド、金属イオンのキレート化によりフリーラジカルの生成を抑えるトランスフェリンやセルロプラスミンなどのタンパク質などが挙げられる。次にすでに生成した活性酸素・フリーラジカルを捕促して連鎖反応を断って安定化するラジカル捕促型抗酸化物質がある。この中には水溶性のASA[9]、尿酸[76]、ビリルビン[77]、アルブミン[77]、脂溶性のビタミンE[78, 79]、カロテノイド[80]、ユビキノール[81]などがある。水溶性の抗酸化物質は水溶性ラジカルの捕促の他、脂溶性ラジカル捕促型抗酸化物質の再生も行うことが報告されている[82-84]。一方、脂溶性抗酸化物質は脂溶性ラジカルのみならず、水溶性ラジカルの捕促を行うこともできる[78, 79]。また、フリーラジカルにより生じた損傷を修復し、再生する機能がある。たとえば、膜脂質、タンパク質、遺伝子の損傷のホスホリパーゼ、プロテアーゼ、DNA修復酵素などによる修復、あるいはアシルトランスフェラーゼによるリン脂質の再生などが挙げられる[72]。さらに生体には、活性酸素産生により必要に応じてSOD、CATなどの抗酸化酵素などの合成が誘導されるという適応機能も備わっている[85]。

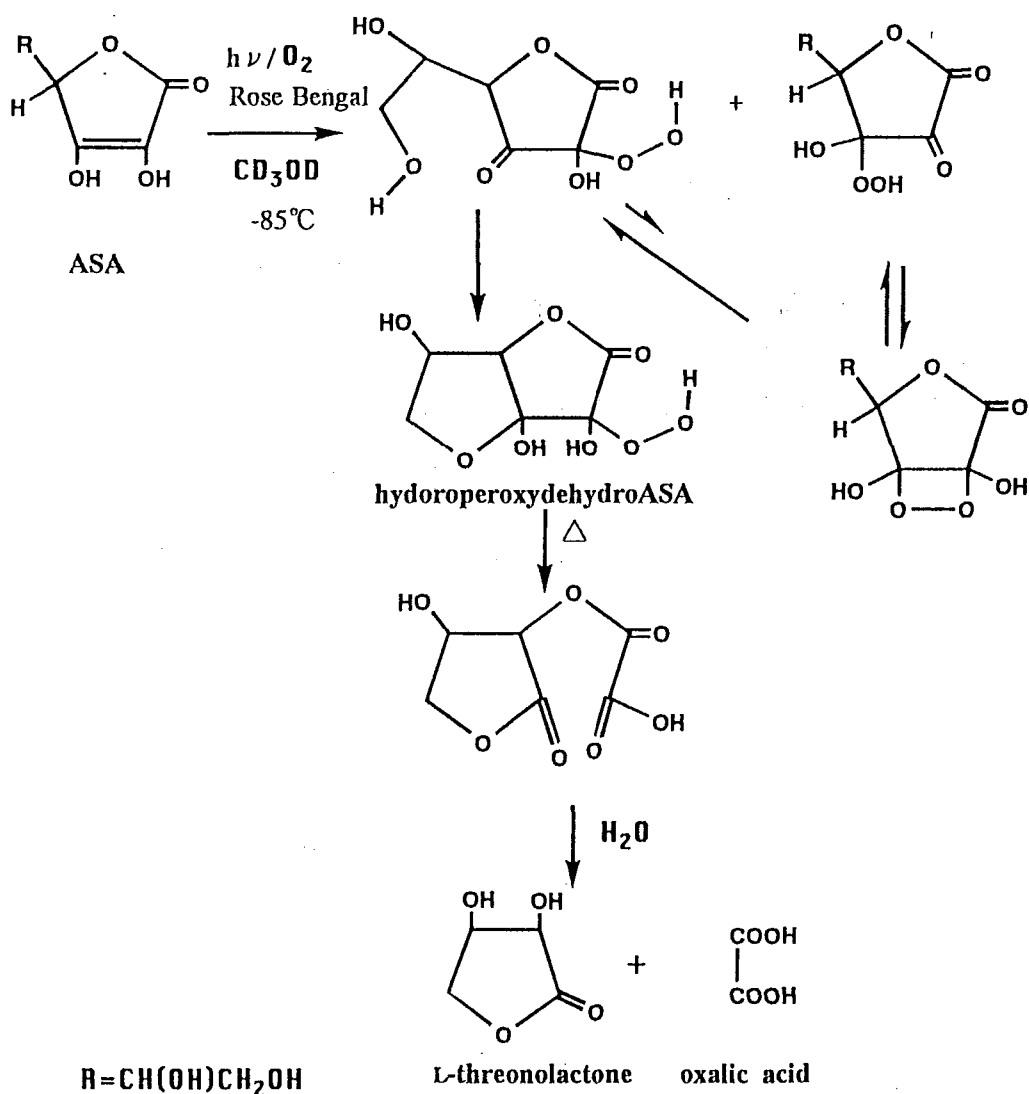
1.6 アスコルビン酸と活性酸素・フリーラジカル

前述のように、ASAはラジカルを捕促する抗酸化物質として水系ラジカルの捕促のみならず、疎水領域のビタミンEラジカルを再生すること

で脂溶性化合物の抗酸化にも関与しており[19-24, 82-84]、生体をフリーラジカルから防御する上で重要な役割を果たしている。特にASAは人間の血漿中に存在するフリーラジカルの捕促剤（スカベンジャー）としては最も有効なもののひとつであるといわれている[86]。ASAはペルオキシラジカル($\text{ROO}\cdot$)と反応してMDASAを生じるなどの特異的な反応を行い、フリーラジカルを捕促してラジカル連鎖反応を止めるが、この他、 O_2^- 、 $\cdot\text{OH}$ 、一重項酸素などの活性酸素を消去することが知られている[87]。

まず、 O_2^- についてはASAは O_2^- を還元してラジカルを消去することが報告されており[88-90]、その反応速度定数は $5\sim 27\times 10^4\text{M}^{-1}\text{sec}^{-1}$ [88, 89]と、SODよりも5桁ほど低い反応性である。ASAと O_2^- との反応については、非プロトン性の溶媒中での反応についても研究されており[91, 92]、2つの研究グループで若干の反応機構の違いはあるが、いずれのグループもMDASAと H_2O_2 の生成を経て最終的にDASAに酸化されるという反応経路を提示している。 $\cdot\text{OH}$ は活性酸素の中でも最も反応性の高いもののひとつであり、ASAも $\cdot\text{OH}$ と容易に反応してラジカルを消去する[50, 93]。その際、 $\cdot\text{OH}$ のASAの2位の炭素(C(2))あるいは3位の炭素(C(3))原子への付加反応が起こるものと考えられており[50]、計算化学的な検討により非解離型の場合に比較して、解離型のASAでは最高被占軌道(HOMO)のC(2)の電子密度が大きくなることからC(2)付加物は生成しやすいと報告されている[94]。ASAの $\cdot\text{OH}$ との反応速度定数は約 $7\sim 11\times 10^9\text{M}^{-1}\text{sec}^{-1}$ といわれている[50]。一方、ASAと H_2O_2 との反応性はかなり低いものと考えられている[87]。ASAは一重項酸素とも反応し、その反応速度定数は約 $8.3\times 10^6\text{M}^{-1}\text{sec}^{-1}$ とされている[95]。この反応生成物としてはOXAとL-スレオノラクトン(THL)が確認されていたが、このASAの一重項酸素による酸化反応機構についてはKwonら[97, 98]が重メタノール中で光増感剤として

ローズベンガルを用いて一重項酸素によるASAの酸化反応を行い、Scheme1-2に示すような反応機構を報告している。彼らは、 ^{13}C -NMRスペクトルの測定の結果などからこの反応がDASAのヒドロペルオキシド、すなわちASAのC(2)酸素付加物を経由して進行し、C(2)-C(3)炭素結合の開裂を伴い、OXAとTHLが生成するという反応機構を提示している。



Scheme 1-2 Photooxidation pathway of ASA

[B.-M. Kwon and C.S.Foote, *J. Am. Chem. Soc.* **110**, 6582(1988)^[97]]

さらにこれら活性酸素とASA酸化分解反応中間体との反応についても研究されており、DASAと O_2^- との反応について非プロトン性の溶媒中でその反応機構や反応生成物が調べられている。DASAのC(3)あるいはC(2)に O_2^- が付加し、ジオキセタン構造を経て、さらにもう1分子の O_2^- と反応してC(2)-C(3)の開裂が起こり、OXAとスレオン酸が生成するというASAと一重項酸素との反応機構と非常に類似した反応経路が考えられている[91, 99]。また、最近水溶液中でのDASAと O_2^- との反応によってASAの生成の可能性を示唆する報告もなされている[100]。

しかしながら、ASAはこのようにフリーラジカルの捕促剤として作用するのみならず、その自動酸化反応過程において金属触媒の存在の有無に関わらず O_2^- を生成すること[101]が知られている。この O_2^- は不均化反応により、 H_2O_2 と酸素分子になる[102]。この H_2O_2 による細胞毒性も報告されており[103-106]、多量のASA添加・培養条件下での細胞への悪影響が指摘されている。さらに、金属触媒が共存する場合にはFenton反応としてよく知られている H_2O_2 と重金属イオンとの反応による $\cdot OH$ の生成の可能性[102]も考えられる。このようにASAはラジカルの捕促剤であると同時に酸化促進剤としても作用するという両面性をもっているのである。ASAの場合と同様にその自動酸化反応において O_2^- を生成する反応は糖質[107]、アドレナリン[108, 109]、グルタチオン[110]などにおいても認められ、グルタチオンもASAと同様にラジカルの捕促剤と酸化促進剤の両方の性質を有している[87]。従って、ASAの自動酸化反応における活性酸素の関与は無視できないものと思われる。

1.7 本研究の意義と目的

ASAは食品及び生体系において多様な機能を果たしているが、ASAの食品及び生体系における挙動やその反応機構などの詳細は未だ十分解明さ

れていない。ASAの重要な機能のひとつに抗酸化作用があり、この抗酸化作用の際に必然的に起こる反応がASAの酸化反応である。しかしながら、このASAの酸化反応及び酸化的分解経路の詳細は未だ十分解明されておらず、これら生成物の生成機構等についても不明な点が多く残されている。このASAの酸化反応はASAが抗酸化剤として機能する場合のみならず、ASAの生理作用としてよく知られている種々の水酸化酵素反応の際に補酵素として作用する場合にも見られる反応である。すなわち、生体内で多く見られる水酸化酵素が触媒する反応においてもASAの還元性すなわち電子供与性が重要な役割を果たしているわけであり、その過程でASA自身は酸化されているのである。従ってこのASAの酸化的分解経路の機構、特にASAから一電子酸化によりMDASAが生成するというASAの酸化反応のごく初期の反応過程の機構を明らかにすることは、ASAの食品及び生体系における種々の機能の発現を解明する上でも非常に重要であると考えられる。特に、反応速度は極めて低いながらも金属触媒非存在下でのASAの自動酸化反応について調べることは、ASAの酸化反応における最も基礎的な反応プロセスを明らかにすることになり、ASAの酸化反応機構の詳細を知る上で重要であると思われる。すなわち、ASAの自動酸化反応において酸素分子がASAからの直接の電子受容体として機能するわけであり、ASAによる還元反応の最も基本的なモデル反応系として、ASAの食品及び生体系での挙動を総合的に理解する上で重要な手がかりを得るのに役立つと考えられる。一方、1.2で述べたように水溶液中のみならず、より疎水的環境下でのASAの挙動についての情報を得ることもASAの食品及び生体系での作用機構を明らかにする上で重要であると考えられる。

上記の視点に立ち、本研究では、まず、金属触媒非存在下でのASAの自動酸化反応機構を明らかにすることを目的とした。すなわち、本研究

では水溶液中のみならずメタノールなど非水系の溶媒中でのASAの酸化反応についても調べ、種々の反応条件下でのASAの酸化速度を測定し、ASAの酸化速度に及ぼす要因について調べることにした。酸化反応生成物についてはASAと一重項酸素との反応生成物であるTHL及びOXAに特に着目して、ASAの自動酸化生成物の分離・同定を行うこととし、一重項酸素との反応と同様の反応が自動酸化反応においてもみられるか否かについて計算化学的手法も併用して検討することとした。このASAの自動酸化反応においては、前述のようにASAは抗酸化剤としての作用と、活性酸素を生成する酸化促進剤としての作用という2つの相反する機能を発揮する可能性が考えられる。従って、ASAの自動酸化反応機構の意義を抗酸化性と酸化促進性というASAのもつ二面性と合わせて考察していくことにした。

なお、以下に各章の概要を略記する。第II章では、メタノール中での反応を中心に、 $50\ \mu\text{M}$ という希薄なASA溶液に酸素ガスを通気して酸化反応を行い、種々の反応条件下でのASAの酸化速度を測定し、ASAの酸化速度に及ぼす要因について検討した。なお、この $50\ \mu\text{M}$ という濃度はヒトの血中ASAとほぼ同じレベルである。第III章ではASAの自動酸化反応生成物につき、特にASAの一重項酸素による酸化生成物であるTHLとOXAが自動酸化反応においても生成するか否かという点に焦点を合わせ、検討した。第II章及び第III章の結果から、ASAの自動酸化反応においても一重項酸素の場合と同様な反応機構が存在する可能性が示唆されたことから、第IV章では、ASAの自動酸化反応機構について、分析化学的手法と計算化学的手法の両方を用いて検討を行い、その結果をふまえてASAの新たな自動酸化反応機構を提示した。第V章では、ASAと同様の部分構造を有するASA関連化合物について、ASAの場合と同様な自動酸化反応機構が適用されるか否かについて検討した。

第II章 種々の条件下でのアスコルビン酸の分解について

2.1 目的

本章では50 μ Mの濃度のASA溶液の酸化反応を酸素ガスを通気下に行い、種々の条件下での酸化反応によるASA分解率を調べ、ASAの分解速度に及ぼす要因を調べることを目的とした。

まず、溶媒の種類による影響を調べることにした。ASAは水溶性化合物であるため、従来主として水溶液中での挙動についてのみ研究されてきた。非水系については金属触媒存在下で、アセトニトリル-水混合系でのASAの酸化反応を調べた報告[18]があるだけで、ほとんど研究は行われていない。そこで本研究では水溶液以外に非水系でのASAの酸化反応についても調べることにした。ASAの有機溶媒への溶解性は極めて低く、特に非極性溶媒にはほとんど溶解しない。そのため、有機溶媒の中でもASAの溶解度の比較的高いものから、両性溶媒であるメタノールとエタノール、非プロトン性溶媒であるアセトニトリルを取り上げることにした。

次に、非水系でのASAの酸化反応のうち、特にメタノール中での反応について、ASA初濃度、反応温度、光のASA酸化速度に及ぼす影響について調べることにした。さらに、ASAの溶液中での存在形態の違い、すなわち解離の有無がASA酸化速度に及ぼす影響についても調べることにした。

ASAの酸化を促進する因子としては、遷移金属イオン、光線、酸素、温度の上昇などが挙げられる[46]が、その中でも金属イオンはASAの酸化反応における触媒作用は大きいことが知られている[45, 49, 11]。そこで、本研究では、食品及び生体内での量的に比較的多い遷移金属である鉄と銅に着目した。通常生体内では、鉄や銅などの遷移金属はヘモグロビンなどのようにタンパク質等にキレートした形で存在するものと考えられているが、生体内でもごく一部は遊離の状態が存在するものと考え

られている。この遊離の鉄や銅がしばしば、細胞傷害を引き起こすことも報告されている[112]。また、これら遷移金属はASAの酸化反応において触媒として作用することがよく知られており、金属イオン共存下でのASAの酸化反応についての研究が広く行われてきた[40-45]が、その中でも鉄と銅に関するものが特に多い。そこで、本研究では鉄と銅を選び、その水溶液中及びメタノール中でのASAの酸化反応への影響を調べることとした。

一方、ASAの酸化を抑制する因子としては還元性物質(チオ尿素、SH化合物、尿酸、ジチオスレイトールなど)[113]、キレート剤(EDTA、DETAPAC、リン酸、クエン酸など)[46]、糖類(ショ糖、コーンシロップなど)[37]、グリセリン[46]、プロピレングリコール[46]などの他、タンパク質関連物質[39]も報告されている。一部のアミノ酸(ヒスチジン、グルタミンなど)[29, 35, 114]、ペプチド(グリシルグリシルヒスチジン、グリシルヒスチジルリジンなど)[35]、タンパク質(血清アルブミン[114]、セルロプラスミン[114]、プロタミン[115]など)によるASA酸化抑制効果が報告されている。その多くはタンパク質が反応液中に存在する微量金属にキレート作用し、ASAの酸化を抑えるためと反応機構を推定している。しかしながら、一部のタンパク質やペプチドなどとASAの直接的な相互作用によるASAの安定化を指摘する報告[35, 115, 116]もある。また、ASAの自動酸化反応過程において、 O_2^- や H_2O_2 などの活性酸素種が生成することが指摘されており、ASAが O_2^- によっても酸化されるのでこの O_2^- を消去するSODの存在下ではASAの酸化が抑制されると報告されている[101]。そこで本研究ではASAの酸化反応に対するタンパク質の影響を調べるために、活性酸素消去酵素としてSOD及びCATを取り上げ、そのASAの酸化反応に対する影響を調べるとともにその作用機構についても考察することにした。さらに血液中に高濃度に存在する血清アルブミン

(本研究ではBSAを用いた)をはじめとする種々の非酵素タンパク質についてもASAの酸化反応に及ぼす影響を金属触媒非存在下において調べる
こととした。

2.2 実験材料と方法

2.2.1 アスコルビン酸の自動酸化反応

ASAは和光純薬(株)製の特級試薬を再結晶して用いた。水は精製水(小堀製薬(株)、局方)をさらに卓上型超純水装置ピューリックZ(オレガノ(株))で精製した超純水(抵抗率; $18\text{M}\Omega \cdot \text{cm}$)を用いた。メタノールは和光純薬(株)製の特級を用いた。また必要に応じて、この市販メタノールをガラス製の蒸留装置を用いてさらに2回蒸留した精製メタノールも用いた。緩衝液としては0.07Mリン酸緩衝液($\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-K}_2\text{HPO}_4$, pH7.4)を用い、Chelex-100(100~200メッシュ、バイオ・ラッド(株))のカラム(カラムサイズ; $0.9 \times 18\text{cm}$) [49]を通して重金属をできるだけ除去した。その他の試薬は市販の特級試薬をそのまま用いた。

2.2.1.1 アスコルビン酸の酸化反応

ASAを $50\ \mu\text{M}$ の濃度でメタノールに溶解し、このASA溶液、200mlに酸素ガスを $200\text{ml}/\text{min}$ の流速で30分間または60分間通気して 25°C で酸化反応を行った。(Fig. 2-1参照)なお、ASAのナトリウム塩(ASA-Na)についてはメタノール及びエタノールには溶解しにくいのでごく少量の水に溶解した後、最終の水濃度が0.1%の濃度になるようにメタノール及びエタノールを加えてASA-Naアルコール溶液を調製した。

2.2.1.2 光を完全に遮断した条件でのアスコルビン酸の酸化反応

夜間、暗幕により窓を覆った室内で照明をつけずに実験を行った。さらに完全を期するため、反応系全体を厚さ 0.03mm の黒色のポリエチレンシート4枚で覆い、2.2.1.1の実験条件に従いASAの酸化反応を行った。

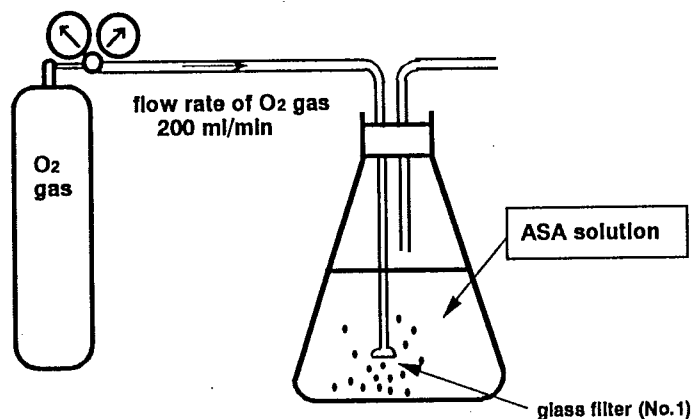


Fig. 2-1 ASAの酸化装置

2.2.1.3 種々の溶媒中でのアスコルビン酸の酸化反応

ASAを $50\ \mu\text{M}$ の濃度で純水、エタノール、アセトニトリルに溶解し、2.2.1.1の条件で酸化反応を行った。なお、ASAはアセトニトリルに溶解しにくいのでごく少量の水に溶解した後、水の最終濃度が0.1%になるようにアセトニトリルを加え、ASAの0.1% $\text{H}_2\text{O}-\text{CH}_3\text{CN}$ 溶液を調製した。

2.2.1.4 金属触媒共存下でのアスコルビン酸の酸化反応

ASAの水溶液中及びメタノール中での酸化反応に及ぼす金属イオンの影響を調べた。Fe(III)として $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、Cu(II)として $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ を用い、試薬はいずれも和光純薬(株)製の特級を用いた。

Fe(III)共存の影響を調べる実験では、 $5\ \mu\text{M}$ 、 $10\ \mu\text{M}$ 、 $20\ \mu\text{M}$ の濃度になるように FeCl_3 をASA純水溶液及びメタノール溶液に溶解して2.2.1.1の条件で 25°C で酸化反応を行った。また、Cu(II)共存の影響を調べる実験では、 $0.1\ \mu\text{M}$ 、 $5\ \mu\text{M}$ の濃度になるように CuSO_4 をASA純水溶液及びメタノール溶液に溶解して同様に酸化反応を行った。

2.2.1.5 活性酸素消去酵素共存下でのアスコルビン酸の酸化反応

水溶液中でのASA酸化反応系における O_2^- の発生の有無を調べたScarpaらの方法[101]に従い、 $50\ \mu\text{M}$ 濃度のASAを含有する0.07Mリン酸緩衝液

(pH7.4)または純水に 2×10^{-7} Mカタラーゼ(catalase:CAT)、 1×10^{-6} Mスーパーオキシドジスムターゼ(superoxide dismutase:SOD)が両方または単独で共存する場合について、それぞれ35°Cにおいて酸素ガス通気下に、30分間酸化反応を行い、ASA残存量を求めた。なお、SOD及びCATは和光純薬(株)のそれぞれ牛赤血球由来Cu, Zn-SOD(生化学用)、牛肝臓由来CATを用いた。

CATの酵素作用のASA酸化反応への影響を調べる実験では、90°Cで5分間加熱したCATを失活CATとして用いてリン酸緩衝液及び純水中においてASA酸化反応を行い、CAT存在下及び非存在下の場合とASA残存率を比較した。

SODの酵素作用のASA酸化反応への影響を調べる実験では、SODの阻害剤として知られているシアン化カリウム(KCN)とアジ化ナトリウム(azide)を反応系に共存させ、ASA酸化反応を35°Cで行い、阻害剤非存在下及びSOD非存在下の場合とASA残存率を比較した。なお、阻害剤はそれぞれ1.5mM KCN、3mM azideの濃度で用いた。

2.2.1.6 種々のpHでのアスコルビン酸の酸化反応

ASAの酸化反応に対するpHの影響を調べるために、pH3、4.75、6、7.4のリン酸緩衝液中でASAの酸化反応を2.2.1.1の条件下で35°Cで30分間行った。

2.2.1.7 H₂O₂共存下でのアスコルビン酸の酸化反応

ASAとH₂O₂との反応性を調べるために50 μM (ASA水溶液に同濃度) ~ 250 μMのH₂O₂を加え、35°Cで酸素ガスを通気せずに30分間酸化反応を行った。対照としてH₂O₂を加えずに同様の条件でASA酸化反応を行い、ASA残存率を求めた。

2.2.1.8 非酵素タンパク質共存下でのアスコルビン酸の酸化反応

非酵素タンパク質のASAの酸化反応に対する影響について調べるために、2.2.1.1の実験条件下で純水中及びリン酸緩衝溶液中で、各種タンパク質共存下35℃におけるASA酸化反応を行い、残存率を求めた。タンパク質は牛血清アルブミン(BSA)(Sigma)、ヒト血清由来の γ -グロブリン(生化学用、和光純薬(株))、卵製アルブミン(オボアルブミン)(化学用、和光純薬(株))、卵白リゾチーム(生化学用、和光純薬(株))を用いた。なお、それぞれのタンパク質の濃度は、BSA、オボアルブミン、リゾチームはSODとCATの中間の濃度の $0.5\mu\text{M}$ を、 γ -グロブリンはBSAと同重量%濃度($33\mu\text{g/ml}$)を用いた。

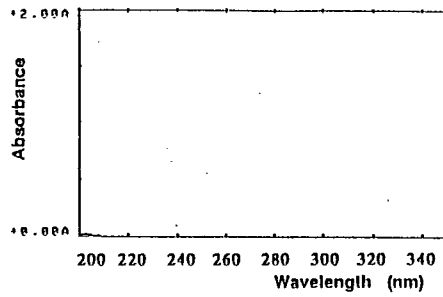
2.2.2 アスコルビン酸の残存率の測定

2.2.2.1 水溶液及びアセトニトリル溶液中のアスコルビン酸残存率の定量

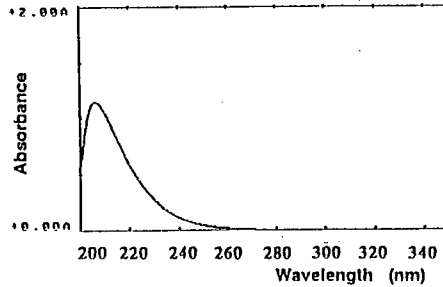
ASA酸化反応液を経時的に採取し、その溶液の吸収極大近辺(水溶液；265nm, アセトニトリル；240nm)での吸光度をダブルビーム分光光度計UV-180(島津製作所)を用いて測定し、残存するASA量を測定した。

2.2.2.2 メタノール及びエタノール溶液中のアスコルビン酸残存率の定量

メタノールに酸素ガスを通気すると、ASAの存在の有無に関わらず、205nm近辺に吸収極大を示すピークが認められた。(Fig. 2-2参照)この現象はメタノールのみならず、エタノール、プロパノール等の他のアルコールにおいても認められた。なお、溶液を振とうするなどの物理的方法により溶媒中の酸素ガス濃度を低下させるとこのピークは小さくなるが、原因については不明である。この紫外部(UV)吸収により、メタノール中でのASAの吸収極大である245nmでの吸光度も影響を受け、吸光法による定量が不可能となるため、高速液体クロマトグラフィー(HPLC法)に



A. UV spectrum of MeOH before bubbling of oxygen gas



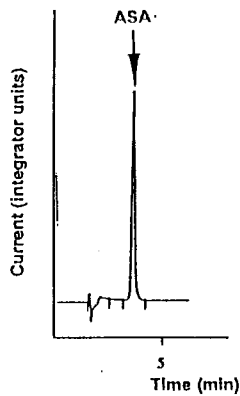
B. UV spectrum of MeOH after bubbling of oxygen gas for 15 min

Fig. 2-2 Effect of bubbling of oxygen gas on UV spectrum of MeOH

よりASAの定量を行った。分析条件は次に示すとおりである。ASAの保持時間(RT)は、3.5分であった。

Chromatographic Condition

- Packing materials ; LiChrosorb NH₂
- Column size ; 4.6 mm (i.d.) x 150 mm
- Eluent ; CH₃CN : H₂O : CH₃COOH= 50 : 20 : 2
- Apparatus ; Shimadzu LC-10AD
- Detector ; Electrochemical Detector (BAS LC-4B)
- Potential : 500 mV vs. Ag/AgCl
- Flow rate ; 1.4 ml/min
- Injection volume ; 20 μ l



High performance liquid chromatogram of ASA in MeOH

2.2.2.3 アスコルビン酸残存率の算出方法

ASA溶液調製時、すなわち反応時間0分のASA濃度を100%として、各反応時間でのASA濃度を%で表したものをASA残存率とした。

2.2.2.4 検定法

各有意差の検定はStudentのt-検定により行い、危険率5%以下を有意と判定した。

2.2.3 分子軌道法の計算方法

分子軌道法の計算には以下に示すようにJ. J. P. Stewartらにより開発された半経験的分子軌道法プログラムであるMOPAC version 6.0を用い、PM3ハミルトニアンにより計算を行った。コンピュータは主としてCOMTEC-4DRPC(ダイキン(株))を用い、場合により、東京大学大型計算機センターを利用した。

Method for MOPAC calculation

COMPUTER : COMTEC-4DRPC

MOPAC : Version 6.0 ; from Dr. James J.P. Stewart, Frank J. Seiler
Research Laboratory, U.S. Air Force Academy, Colorado
Springs, Colorado 80840-6528, USA. HITAC Version, by
T. Hirano (Tokyo Univ.) and T. Okada (Teijin) . Oct. 1989.

MOLGRAPH : Most of the results of calculations were visualized by
use of MOLGRAPH developed by DAIKIN.

2.3 結果及び考察

2.3.1 溶媒の種類

各種溶媒中での酸素ガス通気下でのASAの酸化反応におけるASA残存率をFig. 2-3に示す。ASA残存率は反応時間60分においては水中では82.5%であるのに対し、メタノール中で50.2%、エタノール中で53.6%、アセトニトリル中で56.1%を示した。非水系でのASA残存率はほぼ同程度であり、水中に比較してASA残存率が有意に低く、分解速度が高いことが認められた。本実験条件では酸素ガスを通気しているので溶液中の酸素濃度は飽和状態になっているものと考えられ、この結果は各溶液での酸素の溶解度が関与しているものと考えられる。有機溶媒中の酸素の溶解度については、一般的に水中に比較して高いことが知られているが、測定機器の開発が遅れていることなどにより、詳細なデータは未だ得られていない。現在までに明らかにされている一部の有機溶媒中での酸素溶解度[117]を水と比較してTable 2-1に示す。メタノール、エタノール中での酸素溶解度はそれぞれ、32.60mg%、31.73mg%であった。アセトニトリルのデータはないが、他の有機溶媒の溶解度が30~50mg%とほぼ同程度であることから、アセトニトリルでの溶解度はメタノール、エタノールと同程度であろうと推測された。このようにメタノールなど有機溶媒中での酸素溶解度は水中での場合と比較して約10倍高いことから考えて、今回認められた水中と有機溶媒中におけるASAの安定性の違いは溶液中の酸素ガスの濃度の違いに起因しているものと考えられた。以降、メタノールを中心にASAの自動酸化反応について調べることにする。ASAの分解速度については水溶液中において金属触媒非存在下では非常に小さいことが報告されている[49]。そこで今回このメタノール中の微量金属の影響を確認するためにFe及びCuのイオンクロマトによる分析を行い、0.5ppb以下であることを確認したが、さらにごく微量の金属の混入の可

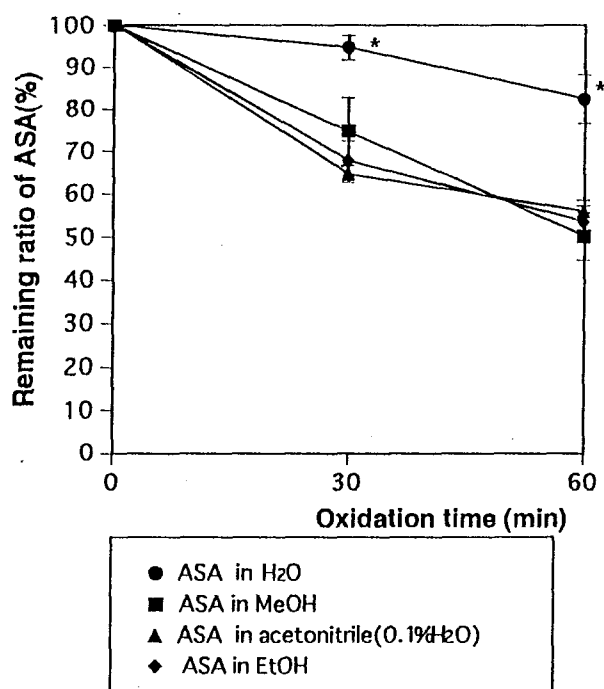


Fig. 2-3 Degradation of ASA In various solvent

* $p < 0.001$,
significantly different from ASA in MeOH

Data represent means \pm SD (n=4~5) and are expressed as a ratio, with the initial amounts of ASA regarded as 100%.

Concentration of ASA ; 50 μ M

Reaction solution ; H₂O, MeOH, acetonitrile(0.1% H₂O), EtOH

Reaction temperature ; 25°C

Table 2-1 Solubility of oxygen gas in solvent

Solubility of oxygen (mg/100ml)	
H ₂ O	4.07
methanol	32.60
ethanol	31.73
octane	37.42
hexane	49.80
benzene	29.34
heptane	45.70
acetone	32.93

(化学便覧、改訂4版、基礎編Ⅱ、日本化学会編^[117])

能性を除去するために市販の特級メタノールをさらに全ガラスの装置でさらに2回蒸留した精製メタノールを用いて同様の実験を行った。その結果、確かにこの精製メタノールを用いた場合も、ASA残存率は反応時間60分で78.8%と市販のメタノールに比較して分解は低下するものの、ASAの酸化分解反応は確かに認められた。(Fig2-4) そこで以下の実験では特に必要な場合を除き、市販の特級メタノールを用いて行うこととした。

2.3.2 アスコルビン酸初濃度の影響

ASAのメタノール溶液に酸素ガスを通気したときのASA分解量について調べたところ、反応時間60分間においてASA残存率は500 μ Mで86.6%、100 μ Mで77.0%、50 μ Mで50.2%、25 μ Mで5.6%となり、特に希薄溶液においては金属触媒非存在下においても酸素が存在するだけでかなりの割合でASAが分解することが認められた。(Fig. 2-5参照)

このASAの濃度の違いによるASAの分解速度に影響する要因を考察する手がかりとしてASAのメタノール中での存在形態を調べるためにUV吸収スペクトルを測定した。それぞれの吸収極大は500 μ M、100 μ M、50 μ Mにおいては約246nmであったが、25 μ Mにおいては約254nmとなり、濃度による吸収極大の変化が見られた。また11 μ Mでは約260nmとなるなど、さらに希薄溶液では吸収極大が長波長側へシフトする結果が認められた。水溶液中におけるASAの非解離型の吸収極大は245nm、解離型（モノアニオン）の吸収極大は265nmであると報告されている[118]。非水系ではASAは非解離型をとっていると考えるのが妥当であり、通常濃度ではメタノール中でも245nm近辺の吸収極大を示すが、非常に希薄な溶液中では、一部解離型をとっている可能性も考えられる。この存在形態の違いが酸化のしやすさに関与する要因のひとつと推測される。

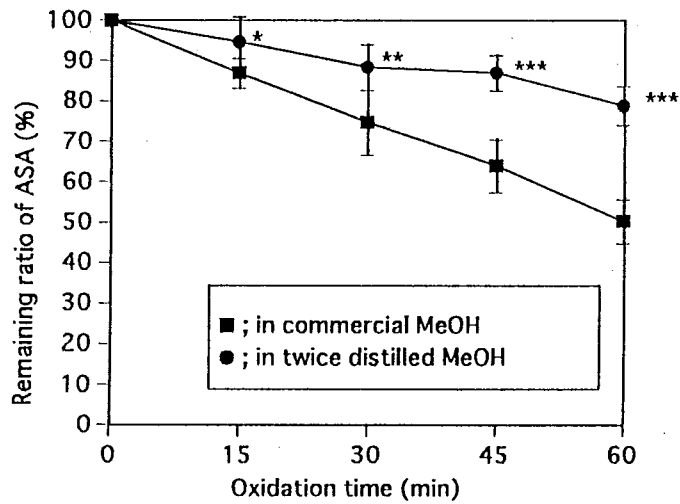


Fig. 2-4 Effect of distillation on the autoxidation of ASA In MeOH

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, significantly different from ASA in commercial MeOH

Data represent means \pm SD ($n=5$) and are expressed as a ratio, with the initial amounts of ASA regarded as 100%.

Concentration of ASA ; $50 \mu\text{M}$

Reaction temperature; 25°C

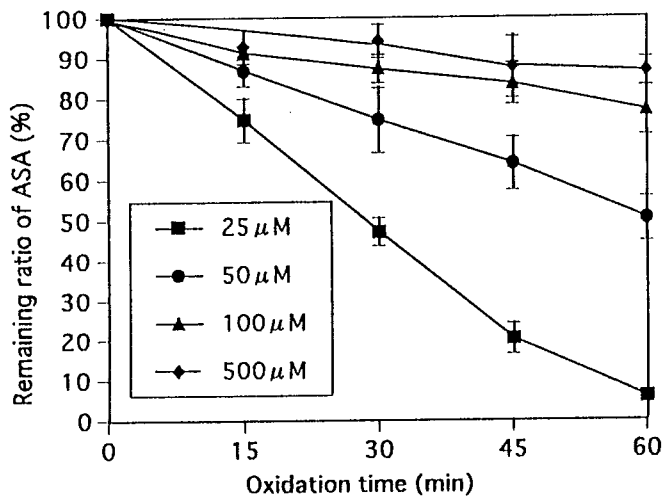


Fig. 2-5 Degradation of various concentration of ASA In MeOH

Data represent means \pm SD ($n=5\sim6$) and are expressed as a ratio, with the initial amounts of ASA regarded as 100%.

ASA concentration : $25 \mu\text{M}$, $50 \mu\text{M}$, $100 \mu\text{M}$, $500 \mu\text{M}$

Reaction solution : MeOH

Reaction temperature : 25°C

2.3.3 温度及び光の影響

メタノール中でのASAの酸化反応に対する温度の影響について調べた。(Fig. 2-6参照) 35°C、40°Cで反応したところ、反応時間30分において25°C、35°C、40°CでのASA残存率はそれぞれ74.7%、51.2%、42.3%となり、25°Cでの場合に比べ、ASA分解率は35°C、40°Cの場合の方が有意に大きかった。温度を上昇させることにより、その熱エネルギーによってASAと酸素分子の運動エネルギーが高まり、両分子が反応しやすくなったものと考えられる。メタノール中でのASAの減少は一次反応速度式に従うことが認められ、それぞれの温度でのASAの反応速度定数を算出したところ、Fig. 2-7に示すように25°C、35°C、40°Cにおいてそれぞれ、 $1.87 \times 10^{-4} \text{sec}^{-1}$ 、 $6.73 \times 10^{-4} \text{sec}^{-1}$ 、 $9.02 \times 10^{-4} \text{sec}^{-1}$ となった。また、その活性化エネルギーは20.0kcal/molであった。すでに報告されている反応速度定数としては水溶液中のもののみであるが、Buettner[49]が金属触媒非存在下、空気飽和下、リン酸緩衝液中(pH7)で $6 \times 10^{-7} \text{sec}^{-1}$ であると報告している。この値と比較すると本研究での結果は約1000倍ほど大きい。これは前述したように溶媒への酸素の溶解度が関与しているためと考えられる。

今回の実験条件では、昼間、通常の蛍光灯下で酸化反応を行ったが、光の影響を調べるため光を遮断して酸化反応を行った。ASA分解率は光を遮断した場合の方がやや小さい傾向が見られたが、ほぼ同程度の結果が認められた。(Fig. 2-8参照)光はASAの酸化速度に影響を及ぼすとの指摘もある[39]が、今回の実験条件では明確な効果は認められなかった。従って、光(太陽光及び蛍光灯の光)によりASAの酸化反応はやや加速される可能性は考えられるが、ASAの自動酸化反応、すなわちASAと酸素分子との反応には光が特に必要でないことが示唆された。

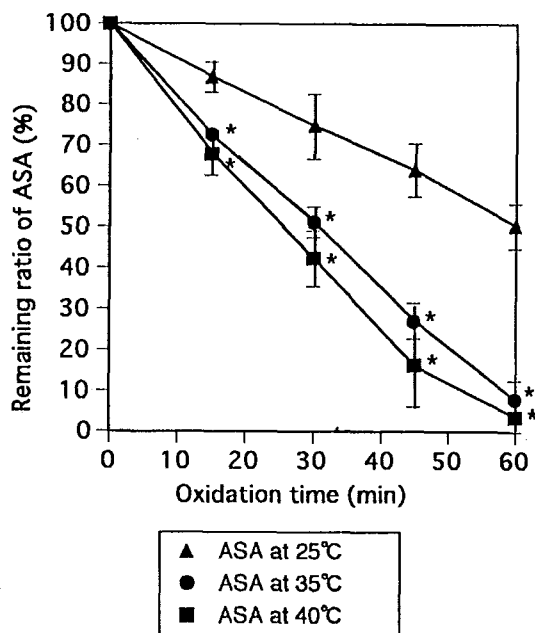


Fig. 2-6 Effect of temperature on the degradation of ASA in MeOH

*p<0.001

significantly different from ASA at 25 °C

Data represent means ± SD (n=4~6) and are expressed as a ratio, with the initial amounts of ASA regarded as 100%.

ASA concentration ; 50 μM

Reaction solution ; MeOH

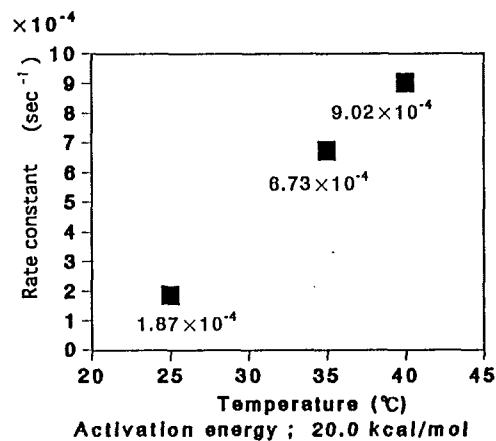


Fig. 2-7 Rate constant and activation energy for the degradation of ASA in MeOH

ASA concentration ; 50 μM

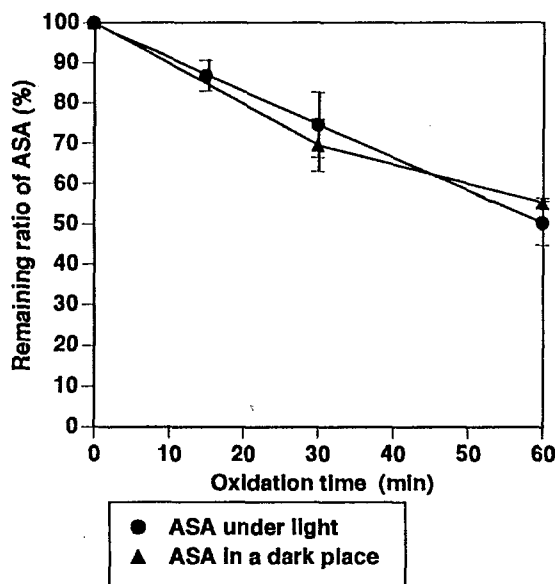


Fig. 2-8 Effect of light on the degradation of ASA in MeOH

Data represent means ± SD (n=4~5) and are expressed as a ratio, with the initial amounts of ASA regarded as 100%.

ASA concentration : 50 μM

Reaction solution : MeOH

Reaction temperature: 25°C

2.3.4 アスコルビン酸の溶液中での存在形態の影響

50 μ MのASAメタノール溶液はUV吸収スペクトル(λ_{\max} =246nm)から判断して非解離型をとっていると考えられるが、同じ濃度でのASAの解離型(モノアニオン)の挙動を調べるためにASAのナトリウム塩(ASA-Na)を用いて同様の反応を行い、非解離型の場合と比較した。なお、50 μ MのASA-Naメタノール(0.1%水含有)溶液の吸収極大は約268nmであり、確かにほとんどが解離型をとっていると推定された。

その結果をFig. 2-9に示す。ASA-Naの残存率は、反応時間30分において61.3%、反応時間60分において42.2%となり、ASAの場合のそれぞれ74.7%、50.2%と比較してそれぞれ、1%、5%の危険率で有意に低い結果となった。この結果の違いがASA-Naを溶解するためにごく少量(0.1%)加えた水の影響によるものか否かを調べるためにASAメタノール(0.1%水含有)の反応系で酸化を行った。その結果、ASA残存率はASAメタノール溶液の場合よりむしろ高い傾向を示したが、有意差はなく、(Fig. 2-10)、水の影響は無視できると思われる。なお、このASAメタノール(0.1%水含有)溶液のUV吸収極大は245nmを示し、非解離型をとっていると考えられる。

このようなASAの解離型と非解離型の酸化のしやすさについてさらに考察するために分子軌道法による検討を行った。半経験的分子軌道法(MOPACのPM3法)による計算結果をFig. 2-11に示す。酸化反応で見られた解離型の方が非解離型よりも酸化しやすいという結果は、分子軌道法による計算結果とも一致するものであった。半経験的分子軌道法(MOPACのPM3法)による最高被占軌道(HOMO)のエネルギーレベルは解離型、非解離型、それぞれ-3.88eV、-9.68eVとなり、解離型の方がエネルギーレベルが高かった。HOMOはその化合物の電子が占有する軌道の中で最もエネルギーレベルが高いもので、還元反応においてはHOMOの電子が電子受容体の化合物に与

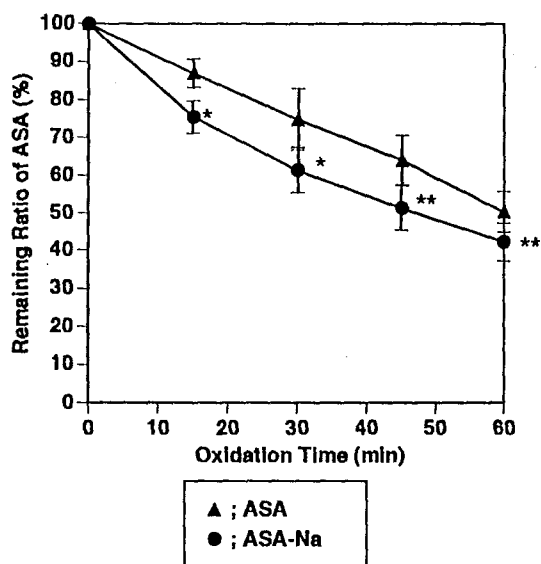


Fig. 2-9 Difference of degradation of ASA between ASA oxidation and ASA-Na oxidation

* $p < 0.01$, $p < 0.05$
significantly different from ASA

Data represent means \pm SD (n=5) and are expressed as a ratio, with the initial amounts of ASA regarded as 100%.

Concentration of ASA ; $50 \mu\text{M}$
Reaction temperature ; 25°C

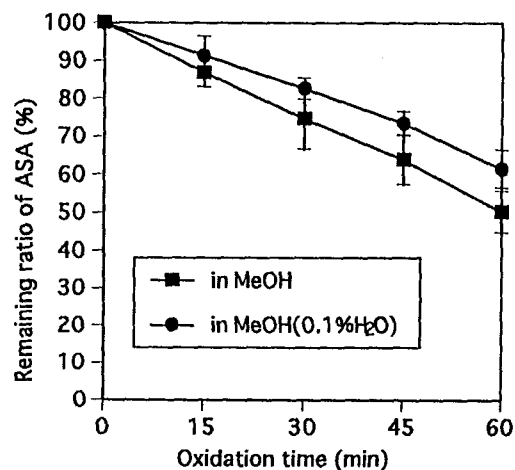


Fig. 2-10 Effect of slight amount of water on the autoxidation of ASA In MeOH

Data represent means \pm SD (n=5~6) and expressed as a ratio, with the initial amounts of ASA regarded as 100%.

ASA; $50 \mu\text{M}$
Reaction temperature ; 25°C

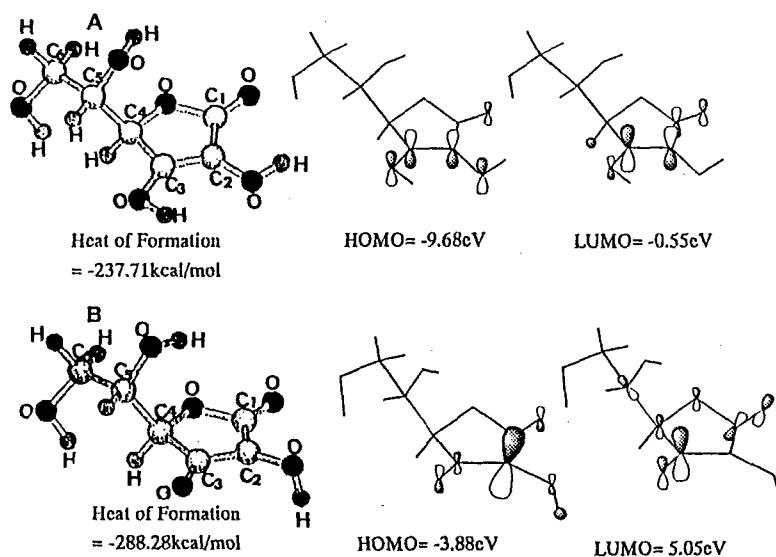


Fig. 2-11 Optimized structure of ASA (non-dissociated) and ASA (anion) with HOMO and LUMO

A ; ASA (non-dissociated)
B ; ASA (anion)

*Optimized structure was visualized by MOLGRAPH developed by DAIKIN Industries Ltd.,

えられる。すなわち、HOMOのエネルギーレベルが高い方が他の分子に電子を与えやすいと考えられている。従ってASAの場合も解離型の方が非解離型よりもHOMOのエネルギーレベルが高いため、酸素分子に電子を与えやすい、すなわち自動酸化反応を受けやすいと推察される。さらに、ASAの解離型と非解離型のHOMOの軌道を比較すると非解離型ではC(2)とC(3)の両炭素原子に存在していた π 電子が解離型ではC(2)に局在化するようになり、C(2)原子に酸素の付加反応がより起こりやすくなることも解離型が酸化されやすいことと関連があるものと考えられる。これらの計算結果はすでに報告されている非経験的分子軌道法である *ab initio*法によるASAの計算結果[94, 119]とも一致するものである。

2.3.5 金属触媒共存の影響

まず、Fe(III)のASAの酸化反応に対する影響をFig. 2-12に示す。ASAの1/10の濃度である5 μ MのFe(III)共存下において、純水中での反応時間30分のASA残存率はFe(III)非共存下、5 μ MのFe(III)存在下でそれぞれ94.8%、71.2%となり、Fe(III)共存によりASAの分解は約5.5倍に促進された。また、メタノール中では反応時間30分でASA残存率はFe(III)非共存下、5 μ MのFe(III)存在下でそれぞれ74.7%、33.4%となり、ASAの分解率は約2.6倍に高くなった。Fe(III)存在下においてもメタノール中でのASA残存率の方が低いのは前述したように溶液中の酸素溶解度の違いによるものと考えられる。さらにFe(III)濃度が高くなると、純水中、メタノール中ともにASAの分解が促進され、メタノール中では10 μ MのFe(III)共存下では反応時間30分でASAはほぼ全て消失した。

次にCu(II)のASAの酸化反応に対する影響をFig. 2-13に示す。5 μ MのCu(II)共存下において純水中では反応時間10分間でASA残存率はほぼ0%になってしまい、Fe(III)の場合よりもASA酸化促進効果が大きいこと

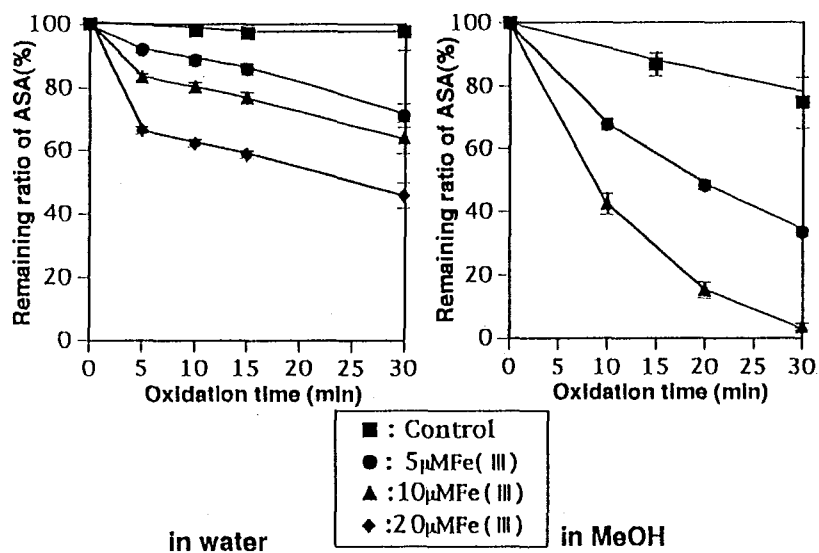


Fig. 2-12 Degradation of ASA In the presence of various concentrations of Fe(III)

Data represent means \pm SD(n=5) and are expressed as a ratio, with the initial amounts of ASA regarded as 100%.

ASA concentration; 50 μ M
Reaction temperature ; 25 $^{\circ}$ C

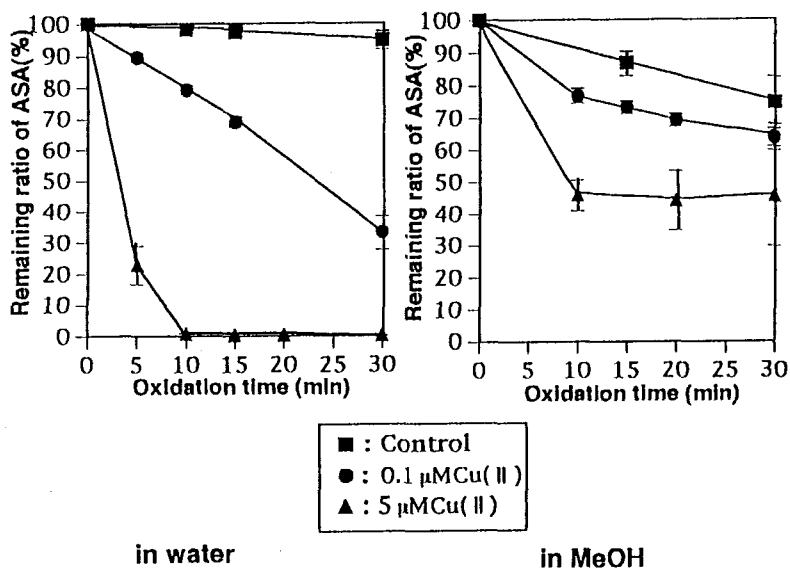


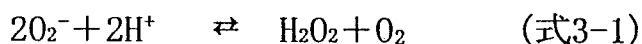
Fig. 2-13 Degradation of ASA In the presence of various concentrations of Cu(II)

Data represent means \pm SD(n=4) and are expressed as a ratio, with the initial amounts of ASA regarded as 100%.

ASA concentration; 50 μ M
Reaction temperature ; 25 $^{\circ}$ C

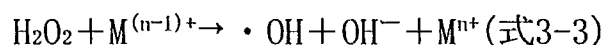
が認められた。これに対し、メタノール中では5 μ MのCu(II)存在下でのASA残存率は反応時間10分以降約45%とほぼ一定の値を示し、水中でのCu(II)存在下の場合よりもASA残存率が高いというFe(III)共存下の場合とは異なる結果となった。ここにはデータを示さなかったが、メタノール中でのCu(II)存在下の反応についてCu(II)濃度を0.5~4 μ Mで変えた場合にもASA残存率はいずれも反応時間10分以降約75%で一定となり、その理由は不明であるが、それ以上にASA残存率が低下する現象は認められなかった。これらの結果からメタノール中においてはCu(II)の共存により、ASA酸化反応のごく初期段階で酸化が促進されるものと推察された。

このように、純水中のみならず、メタノール中においても金属触媒存在下でASAの酸化が促進されることが認められたが、これらの結果はこれらの金属イオンがASAと酸素分子との反応の触媒として作用するのみならず、このASA酸化反応系で生成するヒドロキシラジカル(\cdot OH)などによるASAの酸化の寄与も含めて考えることが必要であろう。この \cdot OHは次の様な反応過程により生成するものと考えられる。ASAの水溶液中での自動酸化過程においてスーパーオキシド(O_2^-)が生成することはすでに報告され[101]、本研究においても追試した結果を第IV章において示すが、さらにメタノール中でのASAの酸化反応においても O_2^- が生成することが、本研究において新たに発見された。(その詳細は第IV章参照)この O_2^- は次式に示す不均化反応(式3-1)や、ASAとの反応(式3-2)により過酸化水素(H_2O_2)を生成することがよく知られている。



一方、Fe(III)及びCu(II)はASAが共存するので、容易に還元され、Fe(II)、Cu(I)に還元される。これらFe(II)、Cu(I)による H_2O_2 の一電子還元により、 \cdot OHが生成するのである。すなわち、この反応は低原子価

の遷移金属(Fe^{2+} 、 Cr^{2+} 、 Cu^+ 、 Ti^{3+})による H_2O_2 の還元反応であり、いわゆるFenton反応としてよく知られているものである[102]。(式3-3参照)



この反応は遷移金属イオンの介する活性酸素生成系、すなわち、metal catalyzed oxidation系としてよく知られている反応系[120]で、本実験系においてはASAが電子供与体として作用している。この $\cdot\text{OH}$ は反応性の高いラジカルで、ASAとの反応速度は $7.2 \times 10^9 \sim 1.3 \times 10^{10} \text{M}^{-1}\text{S}^{-1}$ と報告されており[50]、ASAの自動酸化の反応速度定数として報告されている $5 \sim 40 \times 10^{-3} \text{M}^{-1}\text{S}^{-1}$ [49, 101]に比較すると非常に高い値である。 $\cdot\text{OH}$ は O_2^- や H_2O_2 など他の活性酸素種と比較してもASAとの反応性は非常に高く、金属触媒存在下におけるASAの酸化反応においては $\cdot\text{OH}$ との反応の寄与はかなり大きいものと推察される。

2.3.6 タンパク質共存の影響

2.3.6.1 活性酸素消去酵素

水溶液中におけるASAの酸化分解に対するSODまたはCATの影響をFig. 2-14に示す。Scarpaらの実験[101]をはじめとしてSODを用いた研究では通常緩衝液中で反応が行われていたが、SODの活性はpH4.5～9.5の範囲でほぼ一定なこと[121]から、Chelexで処理したものの緩衝液中にわずかに残っている可能性も考えられる微量金属の影響を完全に除くために本研究では純水中においても反応を行った。その結果、SODまたはCATが全く存在しない場合には、反応時間30分においてASA残存率はリン酸緩衝液中、純水中でそれぞれ62.4%、41.7%であるのに対し、SODまたはCATが存在する場合にはリン酸緩衝液において約73～86%となり、純水中においてほぼ100%を示し、いずれの場合もASAの酸化が非常に抑えられた。このSODまたはCATによるASA酸化抑制効果はリン酸緩衝

液中よりも純水中でより大きかった。純水中ではSODまたはCATが存在する場合、ASA残存率がばらつきはあるものの、ほぼ100%となり、全くASAが分解していないような結果であるが、これは本実験条件(35℃)では反応速度が非常に低いためと考えられ、第IV章でデータを示すが40℃、反応時間60分では約90%と確かにASAの酸化は認められた。また、SODまたはCATが存在するそれぞれの場合のASA残存率の差は純水中ではほとんど認められないが、緩衝液中ではASA残存率は、+SOD+CAT > +SOD > +CATの順で0.1%の危険率で有意差も認められた。この緩衝液中での結果はScarpaらの報告[101]とも一致している。さらにSODまたはCATが全く存在しない場合のASA残存率が、リン酸緩衝液中よりも純水中において有意に低かったのは、ASAのリン酸緩衝溶液、純水溶液のそれぞれのpHが7.4、4.52であったことを考えると理解しにくい結果である。一般的には前述したようにASAは非解離型よりも解離型の方が不安定で酸化を受けやすいと考えられている。ASAの第1解離指数(pK₁)は4.17であることを考慮に入れるとpH7.4ではASAのC(2)の水酸基のほとんどが解離しているのに対し、pH4.52の場合は非解離型が半分近くを占めているものと推察され、pH7.4の場合の方がASAが酸化されやすいと考えるのが妥当であろう。しかしながら、pK₁近辺ではASAは不安定であるとの報告もあり、その理由としてpK₁近辺では解離型と非解離型が等量存在するので、解離型と非解離型が複合体を形成しているためではないか推定されている[28, 30, 31]。そこで、本実験条件において、pH3~7.4の各種リン酸緩衝液中でのASAの酸化反応を行い、ASA残存率を測定した。その結果をFig. 2-15に示す。中性近辺よりも酸性側のほうが、ASA残存率が高くなったが、今回の実験のASA純水溶液のpHに近く、ASAのpK₁にも近いpH4.75ではASA残存率がpH6の場合よりも低くなった。pH4.75ではpH7.4の場合よりも低い傾向は示したが、有意な差は認められなかった。

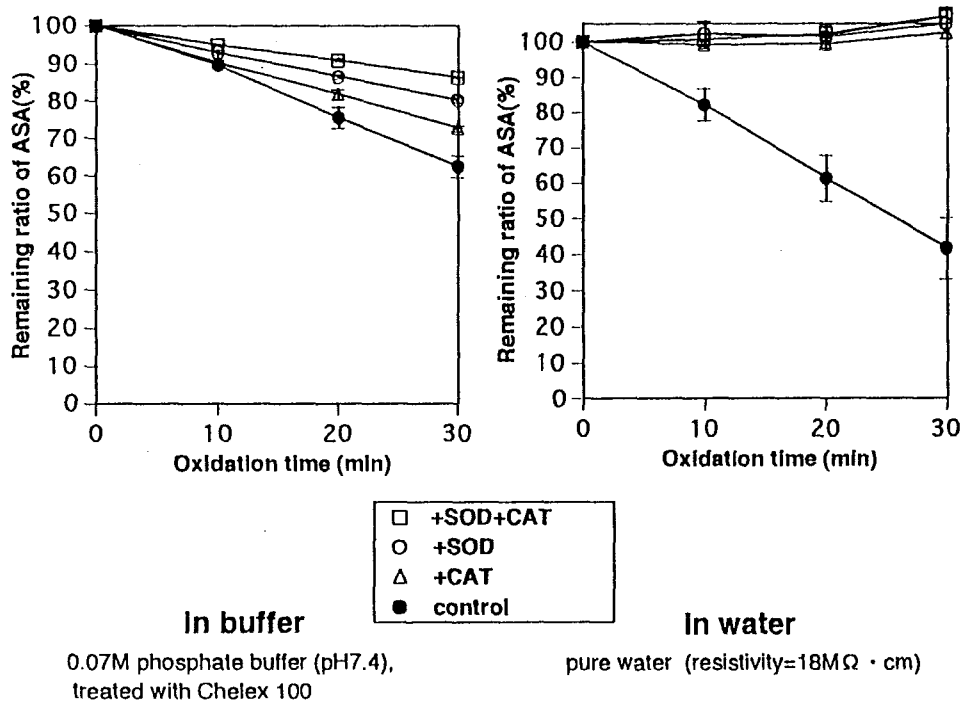


Fig. 2-14 Effect of SOD and CAT on the autoxidation rate of ASA

Data represent means \pm SD (n=4) and are expressed as a ratio, with the initial amounts of ASA regarded as 100%.

ASA; 50 μ M

SOD; 1×10^{-6} M

CAT; 2×10^{-7} M

Reaction temperature; 35°C

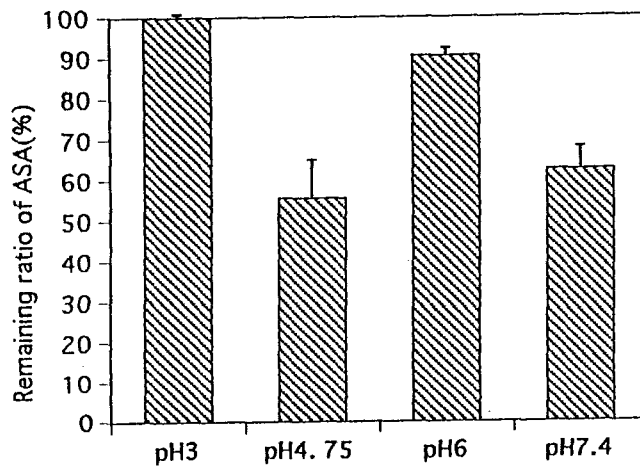


Fig. 2-15 Effect of pH on the degradation of ASA in buffer solution

Data represent means \pm SD (n=5) and are expressed as a ratio, with the initial amounts of ASA regarded as 100%.

ASA concentration ; 50 μ M

Oxidation time ; 30min

Reaction temperature; 35°C

Reaction solution; 0.07M phosphate buffer

これには純水中の場合と異なり、リン酸塩の金属イオンのキレート作用によるASAの安定化[46]なども考えられる。

このように、ASAの安定性に及ぼすSODまたはCATの影響は非常に大きい、その理由としてはSODがASAの酸化反応により生成する O_2^- を消去し、CATが O_2^- の不均化反応等で生じる H_2O_2 を消去することなどが考えられる。そこでさらに、このSODやCATによる酸化抑制効果がこれらの酵素タンパク質に真に特異的であるか否かについて調べることにした。

初めにCATの酵素としての特異的作用の効果について調べることにした。Fig. 2-16は加熱失活させたCATを共存させた場合のASA酸化反応への影響を緩衝液中及び純水中で調べたものである。反応時間30分でのASA残存率は、緩衝液中では失活CATを共存させた場合もCAT共存の場合も約73%となり、純水中では両者とも約100%を示した。これに対し、CATの全く存在しない対照でのASA残存率は緩衝液中で62.4%、緩衝液中で41.7%を示した。このように緩衝液中、緩衝液中のいずれの場合においても失活CATを共存させた場合のASA残存率はCATの場合と同程度で、対照に対してそれぞれ1%、0.1%の危険率で有意な酸化抑制効果が認められた。次にASAの酸化分解に及ぼす H_2O_2 の影響を調べるために、ASA水溶液に H_2O_2 を添加して酸素ガスは通気せずに酸化実験を行った結果をFig. 2-17に示す。この反応系で最大限、ASAと同濃度である $50 \mu M H_2O_2$ が発生した場合を想定しても、ASA残存率は H_2O_2 の存在の有無に関わらず、一定であることが認められた。また、さらに H_2O_2 添加濃度を $100 \sim 250 \mu M$ まで上昇させたが、 $200 \mu M$ 以上でややASA残存率が低下し、 $200 \mu M H_2O_2$ では H_2O_2 無添加に対して有意な差も見られた。 H_2O_2 添加濃度が非常に高い場合(10M)には、ASAと H_2O_2 との反応により、スレオン酸等が生成するとの報告[122, 123]があるが、本実験の反応系で予想される H_2O_2 発生量ではASAと H_2O_2 との反応はほとんど無視できると推察される。また、金属

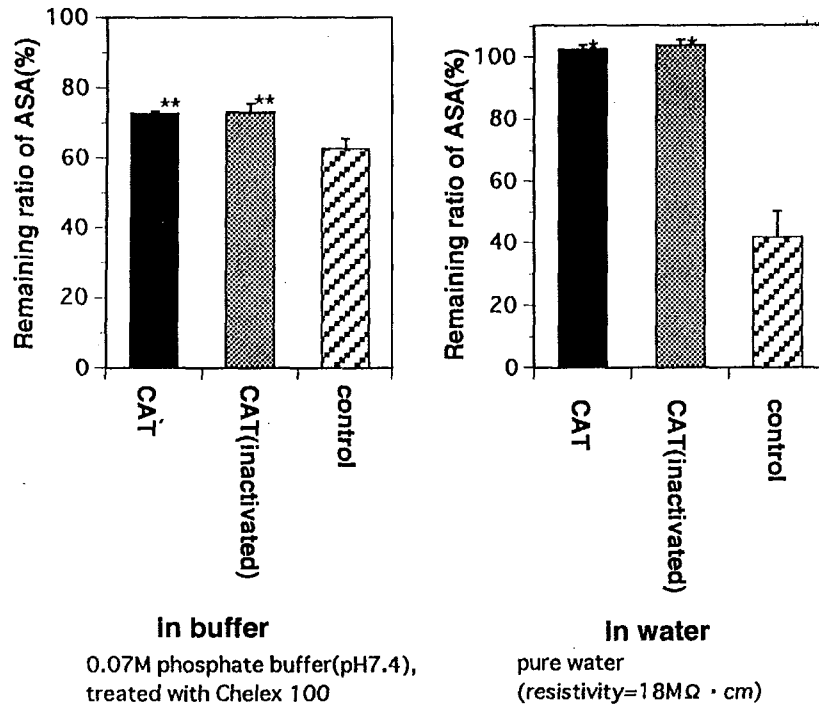


Fig. 2-16 Effect of catalase on the oxidation rate of ASA

* p<0.001, ** p<0.01

significantly different from control

Data represent means±SD(n=4) and are expressed as a ratio, with the initial amounts of ASA regarded as 100%.

ASA; 50 μM

SOD; 1 × 10⁻⁶ M

CAT ; 2 × 10⁻⁷ M

Reaction temperature ; 35°C

Oxidation time ; 30min

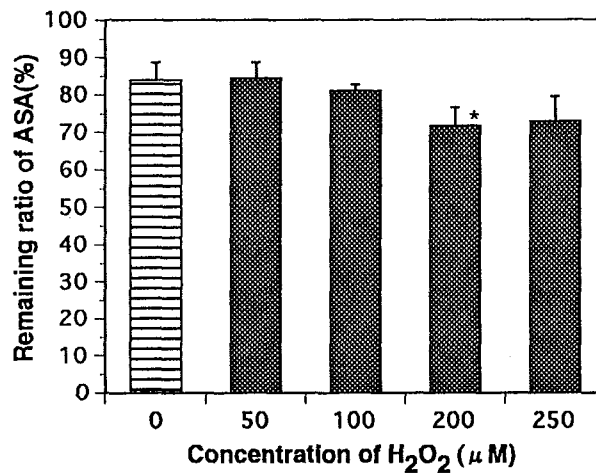


Fig.2-17 Effect of hydrogen peroxide on the oxidation rate of ASA

* p<0.05, significantly different from without H₂O₂

Data represent means±SD(n=4) and are expressed as a ratio, with the initial amounts of ASA regarded as 100%.

Reaction was carried out without bubbling oxygen gas.

ASA concentration ; 50 μM

Reaction time ; 30min

Reaction temperature ; 35°C

触媒存在下では H_2O_2 はFenton反応等により、反応性の高いヒドロキシラジカル($\cdot\text{OH}$)が生成するので、ASAの酸化反応は非常に促進されることが予想されるが、本実験条件のように金属触媒非存在下ではASAと H_2O_2 との反応性は大変低いと考えられる。従って、この金属触媒非存在下で、SODやCATが共存しない場合のASAの分解速度に H_2O_2 はあまり関与していないといえよう。このように失活CATを共存させた場合にもASA酸化抑制効果が見られたこととASAと H_2O_2 との反応性は極めて低いことが確認されたことから、CATのASA酸化抑制効果には酵素の特異的作用の寄与は極めて低いことが推察された。

次にSODによるASA酸化抑制効果が O_2^- 消去能を示す酵素タンパク質に特異的なもののみか否かを知る目的でSODの阻害剤を共存させて反応を行った。Fig. 2-18にSODにその阻害剤であるKCN[124]とazide[125]を加えた場合について調べた結果を示す。純水中ではKCN、azideにより反応液のpHがそれぞれ10以上、8近辺に上昇してしまうため、緩衝液中のみで反応を行った。KCN、azideの濃度は今回用いたCu, Zn-SODが通常阻害されると報告されているそれぞれ1.5mM、3mMを用いた[124, 125]。また、Cu, Zn-SODに対して H_2O_2 は阻害剤として作用すること知られており[124]、さらに H_2O_2 が比較的高濃度(0.04~0.1mM)で存在する場合には強力な酸化剤として作用し、Cu, Zn-SODを失活させることが報告されている[126, 127]。なお、この作用機構については最近、銅を配位した活性中心ヒスチジン残基の特異的酸化に伴う2-オキシヒスチジンの生成が酵素失活の主要因であることが明らかにされている[128]。従って、 O_2^- から不均化反応等により生成する H_2O_2 の影響を除くためにCATを加えて反応させた。その結果、SOD、CAT存在下において、阻害剤が存在する場合は存在しない場合に比較してASA残存率が1%の危険率で有意に低下したが、SODなどが存在しない対照よりASA残存率が0.1%の危険率で有意に高かつ

た。CATによるASAの安定化も考慮に入れてCATを添加した場合と比較すると、SOD、CAT、azideを添加した場合にはCATを添加した場合とほとんど差がなく、また、SOD、CAT、KCNを添加した場合にはCATを添加した場合よりASA残存率がやや高い傾向は示すが、有意な差は認められなかった。以上の結果からSODによるASAの安定化には特異的な酵素作用は確かに作用していることが確認された。しかし、SODのタンパク質としての非特異的な作用、すなわち後述するようなSODとASAの何らかの相互作用やSODの非酵素的な O_2^- の消去作用などの寄与の可能性も無視できないと考えられる。この点については今後さらに詳しい検討が必要であると思われる。

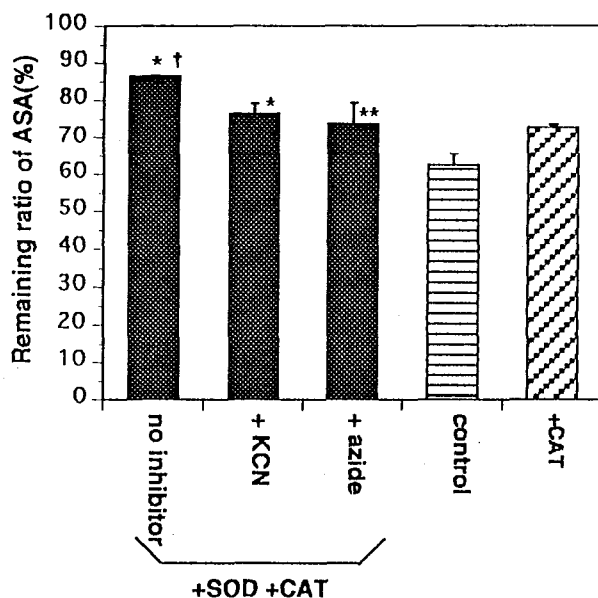


Fig. 2-18 Effect of Inhibitors on SOD In the oxidation of ASA in buffer

* $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ significantly different from control

† $p < 0.01$ significantly different from +CAT

Data represent means \pm SD (n=4) and are expressed as a ratio, with the initial amounts of ASA regarded as 100%.

ASA; $50 \mu\text{M}$

SOD; $1 \times 10^{-6} \text{M}$

CAT; $2 \times 10^{-7} \text{M}$

Inhibitor; 1.5mM KCN

3mM azide

Reaction solution; 0.07M phosphate buffer (pH7.4), treated with Chelex 100

Reaction temperature; $35 \text{ }^\circ\text{C}$

2.3.6.2 非酵素タンパク質

BSA、 γ -グロブリンなどの非酵素タンパク質のASA酸化反応への影響について緩衝液中及び純水中で調べた。緩衝液中での結果を活性酸素消去酵素共存の場合と比較してFig. 2-19に示す。ASAの酸化はこれらの非酵素タンパク質が共存することにより、SOD、CAT共存の場合と同様に抑制されることが明らかになった。特にBSAとオボアルブミンではタンパク質の共存しない対照と比較してASA残存率がそれぞれ1%、5%の危険率で有意に高いことが認められた。次に、純水中での結果をFig. 2-20に示す。純水中においてもASA酸化はこれら非酵素タンパク質共存により抑制され、ASA残存率は、BSA、 γ -グロブリン、オボアルブミンでは0.1%の危険率で、またリゾチームでは1%の危険率で高いことが認められた。

このように特に純水中においてもこれら非酵素タンパク質によってASA抑制効果が見られたことから、金属触媒非存在下においてもASAがタンパク質によって安定化されることが認められた。この現象は従来考えられてきたような、タンパク質により溶液中の微量金属のキレート作用による安定化では説明しがたく、一部の報告[35, 39, 115, 116]で指摘されているようなASAとタンパク質との直接的な相互作用の可能性を支持する結果である。ASAとタンパク質関連物質との相互作用の可能性についてはグリシルグリシルヒスチジン、グリシルヒスチジルリジンなどのペプチドや、ヒスチジン、グルタミンなどのアミノ酸などがASAの酸化抑制効果をもたらすこと[35]や、塩基性アミノ酸を多く含有するプロタミンがASAの酸化を抑えること[115]がその作用機構として指摘されている。これらのタンパク質関連物質が比較的高濃度でないと効果がないこと[35]や、タンパク質吸着クロマトグラフィーの分析結果からASAとタンパク質の複合体形成の可能性が示唆されたこと[115]から、ASAとタンパク質関連

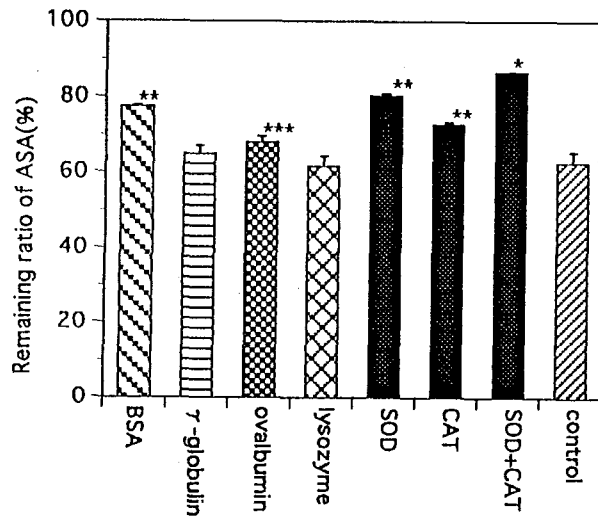


Fig. 2-19 Effect of protein on the oxidation rate of ASA in buffer

* $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.05$
significantly different from control

Data represent means \pm SD (n=4) and are expressed as a ratio, with the initial amounts of ASA regarded as 100%.

ASA : $50 \mu\text{M}$

SOD : $1 \times 10^{-6}\text{M}$

CAT : $2 \times 10^{-7}\text{M}$

BSA, lysozyme, ovalbumin : $5 \times 10^{-7}\text{M}$

γ -globulin : $33 \mu\text{g/ml}$

Reaction time : 30min

Reaction temperature : 35°C

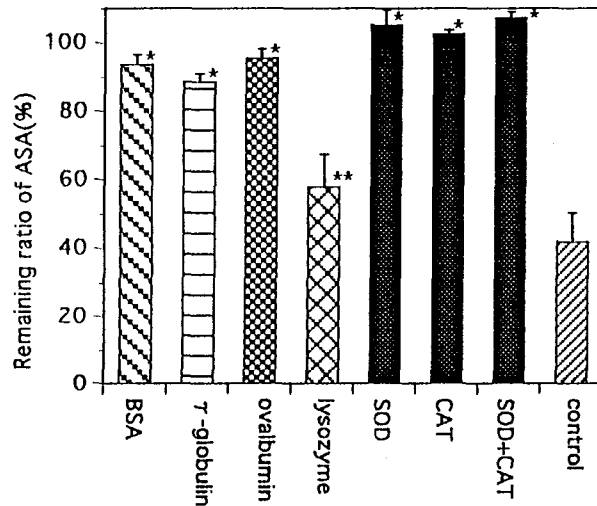


Fig. 2-20 Effect of protein on the oxidation rate of ASA in water

* $p < 0.001$, ** $p < 0.01$
significantly different from control

Data represent means \pm SD (n=4) and are expressed as a ratio, with the initial amounts of ASA regarded as 100%.

ASA : $50 \mu\text{M}$

SOD : $1 \times 10^{-6}\text{M}$

CAT : $2 \times 10^{-7}\text{M}$

BSA, lysozyme, ovalbumin : $5 \times 10^{-7}\text{M}$

γ -globulin : $33 \mu\text{g/ml}$

Reaction time : 30min

Reaction temperature : 35°C

物質との相互作用の可能性が考えられた。その具体的な作用機構については、ASAとタンパク質関連物質との水素結合の可能性も指摘されている[35]が、詳細は未だ不明である。さらに、Meucciら[129]はASA共存下でのBSAの紫外吸収スペクトルがASA非存在下に比較して変化することから、BSAがASAにより何らかの影響を受けることを示すことを報告している。また、当研究室ではASAとBSAの相互作用を紫外吸収差スペクトルを測定して調べたところ、次のような結果が得られた[130]。すなわちpH7のリン酸緩衝液中でASAの吸収極大は約265nmであったが、BSAが共存することにより主要ピークが短波長側にシフトし、BSA濃度が高くなると290nm付近にも新たな吸収極大を持つようになる。この結果に対して、ASAとBSAの相互作用により、ASAの解離型（モノアニオン）からその一部が非解離型やジアニオンをとるようになった可能性が推察されている。ASAがBSAの疎水的領域に入り込むことなどにより、ASAの存在形態が変化したものと考えられる。また、この際BSAのASA共存によりその紫外吸収スペクトルに変化が生じ、ASA非存在下で見られた278nmの吸収極大が長波長側にシフトする結果が認められ、Meucciらの報告[129]と同様にBSAもASAにより影響を受けている可能性が示唆された。このASAとBSAとの相互作用は可逆的であると考えられた。

従ってASAの各種タンパク質による安定化には、このようなASAとタンパク質との直接的な相互作用の関与の可能性が高いと考えられるが、タンパク質[131]やペプチド[132]による $\cdot\text{OH}$ の消去作用や、セルロプラスミン、ペルオキシダーゼ、CATなどによる O_2^- の消去作用[133]も報告されていることから、CATだけでなく本研究で用いた他のタンパク質による酵素作用によらない O_2^- の消去作用の寄与の可能性も十分に考えられる。この点に関してはESRによる分析等によりさらに検討が必要である。

以上の結果から、SODやCATを共存させた場合のASAの安定化には、

SODが有する特異的な活性酸素種消去作用が確かに関与しているが、CATの場合、酵素の特異的な作用の関与の可能性は低いものと考えられた。さらに、BSAなどの非酵素タンパク質の場合と同様に、これらの酵素のタンパク質としての非特異的なASAに対する安定化作用、たとえば微量重金属に対するキレート作用、ASAとタンパク質との非特異的な相互作用を介する安定化、タンパク質の非酵素的な O_2^- の消去作用等が関与している可能性が示唆された。とくにこのASAとタンパク質との非特異的な相互作用による安定化と非酵素的な O_2^- の消去作用によるASAの安定化の可能性は非常に高いと考えられる。

第Ⅲ章 アスコルビン酸の自動酸化生成物

3.1 目的

ASAの酸化分解経路としては従来、MDASAを経由して不均化反応によりDASAの生成を経て分解していく経路が最もよく知られている。さらにDASAは水溶液中ではラクトン環は容易に加水分解し、DKGが生成し、DKGの1位の炭素が脱炭酸してリキソン酸、キシロン酸に分解していく経路とOXAとL-スレオン酸を生成する経路に分かれるといわれている[59-61]。後者のL-スレオン酸等を生成する経路は好氣的条件下における中性及びアルカリ性溶液中で起こると報告されている[60]。また、pHが上昇するほどこの経路の占める割合は大きくなることが知られている。一方、ASAは一重項酸素に対しても強力な消去剤として作用し、その反応生成物としてTHLやOXAが知られている。その反応機構としては、Kwonら[97, 98]は重メタノール中でASAからこのTHL及びOXAがDASAのヒドロペルオキシド(ASAのC(2)酸素付加物)のC(2)-C(3)間の開裂により生成することを報告した。

そこで本章ではまず、Kwonら[97, 98]の実験条件と同じメタノール中でASAが三重項酸素によって酸化を受けた場合、一重項酸素による酸化と同様の反応が起こる可能性の有無について検討を行うこととした。すなわち、一重項酸素によるASAの酸化生成物であるTHL及びOXAが三重項酸素による酸化においても生成するかどうかについて分析化学的手法を用いて調べることにした。前述したようにASAの分解経路として一般的によく知られているのはDASA、DKGを経由して分解する経路で、L-リキソン酸及びL-キシロン酸を生成する経路の他に、OXAとL-スレオン酸を生成する経路がある。(Scheme1-1参照)このDASA、DKGを経由する経路で生成物するOXAとL-スレオン酸は、今回のASA酸化生成物であるTHL及びOXAと、一方は一致し、他方も非常に類似した化合物であるため、メタ

ノール中においてこのTHL及びOXAがDASAを経由して生成しているか否かについて調べ、これらASAのC(2)-C(3)開裂生成物、すなわちTHL及びOXAがDASAを経由せずに生成する可能性につき確認することとした。さらにこのTHL及びOXAが、水溶液中においても生成するか否かについて調べ、この反応が通常の商品及び生体系において進行する可能性につき検討することとした。また、これらTHL及びOXAを生成する反応のASAの自動酸化反応における寄与度を評価するために、ASAのメタノール中の酸化反応についてASA残存率、主要な酸化生成物と考えられるDASAの収率、そして、THL及びOXAの収率を定量し、この反応系について化学量論的に調べることにした。

次に、第II章においてASAの酸化速度について検討した種々の条件下で、このC(2)-C(3)の開裂生成物、特にTHLの収率を中心に調べることにした。すなわち、まず溶媒の影響を調べた。次に現在までほとんど研究が行われていなかった非水系でのASAの酸化反応に関して、特にメタノール中での反応についてASA初濃度、反応温度、光のTHLの収率に及ぼす影響について検討した。さらに、第II章において酸化速度が大きかったASAの解離型の酸化生成物をASAの非解離型の場合と比較し、ASAの溶液中での存在形態の違いがTHL等酸化生成物の収率に及ぼす影響についても調べた。

さらに水溶液中のみならず、メタノール中においてもASAの酸化反応に対する触媒効果が確認されたFe(III)及びCu(II)の反応生成物への影響について調べることにした。すなわちFe(III)等金属触媒存在下、水溶液中及びメタノール中でのASAの酸化反応におけるTHL等、C(2)-C(3)開裂生成物の生成の可能性及びその収率について検討を行った。

3.2 実験材料と方法

3.2.1 アスコルビン酸の自動酸化反応

ASAの自動酸化反応は第II章の2.2.1のASAの自動酸化反応で述べた方法に従って行った。用いた試薬及び反応条件は第II章と同様である。

3.2.2 アスコルビン酸の酸化生成物の分離・同定

ASA酸化反応液(200ml)を30℃以下で減圧下にて濃縮乾固させ、0.5mlのトリメチルシリル(TMS)化剤を加えて揮発性の誘導体にし、GC及びGC-MS分析を行った。なお、TMS化試薬としては、TMSI-H(ジーエルサイエンス(株))[ヘキサメチルジシラザン(HMDS):トリメチルクロロシラン(TMCS):ピリジン=2:1:10]を用い、60℃で5分間加熱し、TMS化を行った。しかし、TMSI-Hは比較的穏やかなTMS化試薬であるのでカルボキシル基とは反応しにくいため、水酸基をもたないカルボン酸のTMS化にはN-メチル-N-トリメチルシリルトリフルオロアセトアミド(MSTFA)を0.5ml加えて室温で30分間放置しTMS化を行った。

ガスクロマトグラフィー(GC)の分析は次の通りである。

Gas Chromatographic Condition(I)

Apparatus	: Shimadzu GC-9A Model Gas Chromatograph
Detector	: FID
Column	: OV-1 capillary column 25m × 0.25mm i.d., df 0.3 μm
Temperature	
Column	: 150℃(5min)-210℃(15min), (5℃/min)
Injection port	: 210℃
Detector	: 230℃
Carrier Gas	: N ₂ gas
Flow Rate	: 0.9ml/min
Splitter	: Ratio ; 1:50
Sample size	: 1.0 μl

ガスクロマトグラフィー-質量分析法(GC-MS)の分析条件を以下に示す。
また、必要に応じて、Finnigan(株)製のGCQ型ガスクロマトグラフ-質量
分析計も用いた。

Experimental Condition of Gas Chromatography-Mass Spectrometry

Gas Chromatography

Apparatus : Hew let Packard 5790 model
Column : OV-1 capillary column
25m × 0.25mm i.d., df 0.3 μ m
Temperature
Column : 150°C(5min)-210°C(15min), (5°C/min)
Injection port : 210°C
Detector : 230°C
Carrier Gas : He gas
Flow Rate : 0.9ml/min
Splitter : Ratio ; 1:50
Sample size : 1.0 μ l

Mass Spectrometry

Apparatus : Japan Electron Optics Laboratory,
JMS-DX300 model Mass Spectrometer
Ionization : Electron Impact Ionization (EI)
Temperature
Ion Source : 180°C
Interface : 180°C

なお、カルボン酸のTMS誘導体には上記分析条件のうち、カラム温度
のみを次のように変更して分析した。GC-MS分析の条件についても同様
である。

Gas Chromatographic Condition(Ⅱ)

Column Temperature : 60°C(5min)- 210°C(15min), (5°C/min)

The other conditions are the same as the Condition(Ⅰ).

標品として、ASA、DASA、DKG、THL、OXA、L-リキソノラクトン、L-キシロノラクトン、スレオン酸、スレオン酸メチルエステル、スレオン酸エチルエステルのTMS誘導体を用いた。DASA[134]及びDKG[60]は常法に従い、次のように調製したものをを用いた。

Synthesis Procedure of DASA

ASA(6.5g)

- Added 200ml of methanol
- Added 12g of activated charcoal (Norit SX plus)
- Bubbled oxygen gas at a flow rate of 200ml/min for 360 min while stirring gently with a magnetic stirrer

Reaction mixture

- Filtered with a glass filter
- Evaporated at 30°C

Dehydro-L-ascorbic acid (DASA) (syrup)

Synthesis Procedure of Potassium 2,3-diketo-L-gulonate

ASA(9.2g)

- Added 50ml of water
 - Added 3.7g of KIO₃
- Colorless solution
- Kept at 4°C for 15min
 - Added 40ml of 1N KOH solution gradually (final pH 5)
 - Kept at 4°C for 2hours
 - Added 800ml of cold ethanol
 - Filtered with a glass filter (No.4)

White precipitate

- Washed with 50ml of ethyl ether
- Dried in vacuo at 4°C

Potassium 2,3-diketo-L-gulonate (DKG)

THL、L-リキソノラクトン、L-キシロノラクトンはそれぞれL-スレオース、L-リキソース、L-キシロースに臭素水を加え10分間放置して酸化し、過剰の臭素を除去し、濃縮乾固して調製した。スレオン酸はスレオン酸のカルシウム塩(Aldrich Chem. Co.)を陽イオン交換樹脂[Dowex 50W-X8(100~200mesh)]により脱塩して調製した。スレオン酸メチルエステル及びスレオン酸エチルエステルは上述したように調製したスレオン酸をそれぞれメタノール中あるいはエタノール中で塩酸触媒存在下、70℃で40分間還流して調製した。それぞれの化合物約5 mgにTMSI-Hを0.5ml加えてTMS化を行った。OXAについてはTMS化試薬としてMSTFAを用いた。

3.2.3 デヒドロアスコルビン酸及びジケトグロン酸の酸化生成物の分離・同定

DASA及びDKGは3.2.2で述べた方法に従って調製したものをを用いた。DASAについては50 μ Mまたは25 μ Mの濃度でメタノールまたは純水に溶解して第II章の2.2.1のASAの自動酸化反応の方法に従って酸化反応を行い、本章の3.2.2に記載の方法に従って酸化生成物の分離・同定を行った。また、DKGについても50 μ Mの濃度でメタノールまたは純水に溶解してDASAの場合と同様に酸化反応を行い、酸化生成物の分離・同定を行った。なお、DKGはカリウム塩の形で調製したものをを用いたためメタノールに溶解しにくいので、ごく少量(1%)の濃度の純水に溶解してから、メタノールを加えてメタノール溶液とした。

3.2.4 ASAの残存率の測定

ASAの残存率の測定は第II章の2.2.2の方法に従って行った。

3.2.5 アスコルビン酸の酸化生成物の定量

3.2.5.1 スレオノラクトンの定量

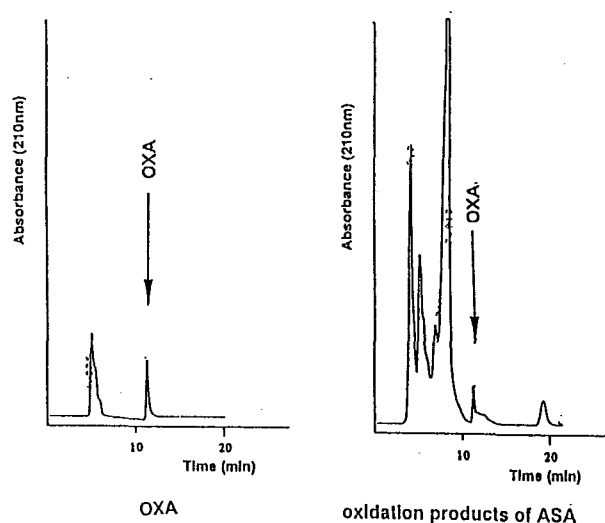
THLの定量はASA酸化反応液を濃縮乾固後、TMSI-HによりTMS誘導体にし、3.2.2の分析条件(I)によりGC分析を行い、GC-MS分析によりTHLのTMS化物と同定されたRT7.8分のピークをピーク面積により定量した。なお、THLの標品は純品が入手しにくいいため、その立体異性体であるエリスロノ- γ -ラクトン(Aldrich Chem. Co.)を用いてTMS化物を調製し標準曲線を作成し、THLの定量を行った。

3.2.5.2 シュウ酸の定量

OXAの定量は上記の反応条件で酸化反応を行った反応液を30°C以下で減圧下にて400倍に濃縮し、次に示すような分析条件の逆相クロマトグラフィーまたはイオン排除クロマトグラフィーを用いたHPLC法により行った。なお、両方法での分析結果にほとんど差がないことは確認してある。

Chromatographic Condition

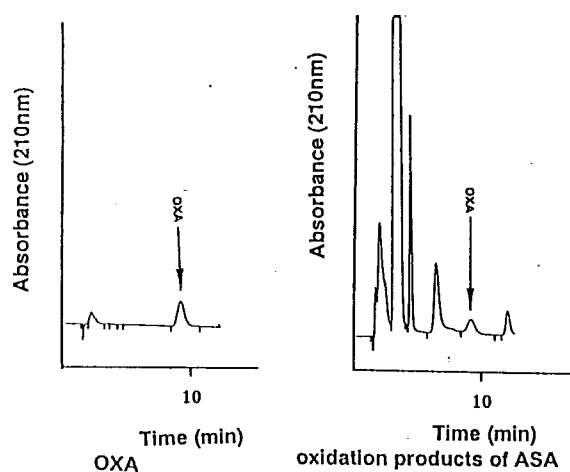
Packing materials ; Unisil Q NH₂
Column size ; 4.6 mm (i.d.) x 150 mm
Eluent ; CH₃CN : 2% H₃PO₄=85 : 10
Apparatus ; Shimadzu LC-10AD
Detector ; UV spectrophotometric detector
(Shimadzu SPD-6A)
UV absorption at 210 nm
Flow rate ; 0.5 ml/min
Injection volume ; 20 μ l



High performance liquid chromatograms

Chromatographic Condition

Column	; Shim-pack IC-A3 (150 x 4.6 mm i.d.)
Eluent	; 5mM sodium phosphate buffer (pH 6.9)
Apparatus	; Shimadzu LC-10AD
Detector	; UV spectrophotometric detector (Shimadzu SPD-6A) UV absorption at 210 nm
Flow rate	; 1.0 ml/min
Column temperature	; 35°C
Injector	; loop (PEEK)
Injection volume	; 20 μ l



High performance liquid chromatograms

3. 2. 5. 3 デヒドロアスコルビン酸の定量

DASAの定量はASA酸化反応条液を経時的に採取し、反応液1mlに350 μ M NaOHのメタノール溶液を0.4ml加えて中和後、5mMジチオスレイトール (DTE) のメタノール溶液を0.1ml加え、室温下で10分間還元反応を行い、DASAをASAに変化させ、第II章2.2.2.2で示したHPLCの分析条件でASAの定量を行い、還元反応前のASA量を差し引いてDASA量を求めた。

3.2.5.4 アスコルビン酸酸化生成物の収率の算出方法

ASA溶液調製時、すなわち反応時間0分のASA濃度を100%として、各反応時間での酸化生成物濃度をモル数で%で表したものをASA酸化生成物の収率とした。

3.2.5.5 検定法

各値の有意差の検定はStudentのt-検定により行い、危険率5%以下を有意と判定した。

3.3 結果及び考察

3.3.1 金属触媒非存在下でのアスコルビン酸の酸化反応生成物

3.3.1.1 メタノール中及び水中におけるASAの酸化反応生成物

ASAをメタノール中で金属触媒非存在下で酸化しTMSI-Hを用いてTMS誘導体にし、GC分析したところ、Fig. 3-1に示すような結果を得た。保持時間(RT) 5分位までのピークはTMS試薬そのものを分析した場合においても見られたので反応生成物ではないと考えられるが、反応出発物質であるASA(RT 22.7分)の他、数本のピークが認められた。ASAはGC-MS分析により分子イオンピークが m/z 464でスペクトルが文献記載のもの[135, 136]と一致しているので、2,3,5,6-tetra-O-trimethylsilyl-L-ascorbic acidであることが認められた。

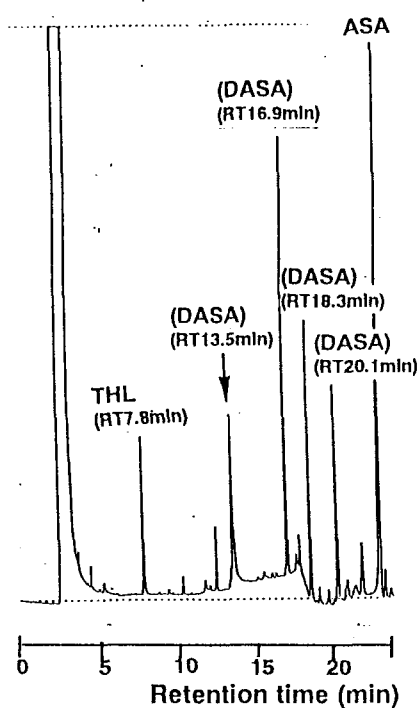


Fig. 3-1 Gas chromatogram of TMS derivatives of ASA oxidation products in MeOH

Reaction time ; 60min
TMS reagent ; TMSI-H

その他のピークについては、まずASAの酸化生成物として最も可能性の高いものにDASA及びDKGが考えられる。DASA及びDKGの標品のTMS誘導体はGC分析により主要ピークだけでも3~4本のピークを示した。これはおそらくDASA及びDKGが溶液中で様々な存在形態をとっている可能性と、不安定な化合物であるためTMS化の過程で複数の化合物へ変化した可能性が考えられる。Fig. 3-1に示したASA酸化反応生成物のガスクロマトグラムについてはDASAの主要ピークと保持時間がほぼ一致するピークが数個認められ、そのうち、4つのピーク（それぞれRTは13.5分、16.9分、18.3分、20.1分である）についてはマススペクトルもDASAの標品のそれらと一致したので、これらの物質はDASA由来のものと推定された。DASAについては、最も大きなピークであるRT 16.9分のピークのマススペクトルをFig. 3-2に示す。m/z 407のピークはM⁺-15であると考えられ、その分子量は422であることから、これはDASAのカルボニル基のひとつがメタノールで溶媒和し、3個の水酸基がTMSエーテルになったもの(DASA (MeOH)+3TMS)と推定された。DASA (MeOH)+3TMSの可能な構造式としてはFig. 3-3に示す2つ、すなわちbicyclicな構造でC(2)が溶媒和したものとC(3)が溶媒和したものが考えられる。このASA酸化生成物のクロマトグラムには現れていないが、メタノール中で合成したDASAの標品のTMS誘導体にはこのRT 16.9分のピーク以外にもマススペクトルが非常に類似したピークがもうひとつ認められたことから、メタノール中でDASAが両方の構造をとっている可能性が示唆された。なお、それぞれの構造についてメタノールの溶媒和のしかたにより、2つの立体異性体が考えられる。当研究室ではメタノール中で合成したDASAをそのままFAB-MS及びNMRにより分析した結果から、bicyclicな構造でC(2)がメタノールで溶媒和したDASAの存在を確認している[137]。従って、DASAの標品においても、ASAの酸化生成物においても最も大きなピークであったRT

16.9分のピークはbicyclicな構造でC(2)がメタノールで溶媒和したDASAではないかと推定された。しかしながらDKGについては、ASA酸化反応生成物のガスクロマトグラム上にDKG標品の主要ピークは認められなかった。これは水溶液中ではDASAは容易に水解されラクトン環が開裂してDKGとなるが、本実験条件のような非水系ではDASAからDKGへの反応は進行しにくいものと考えられる。

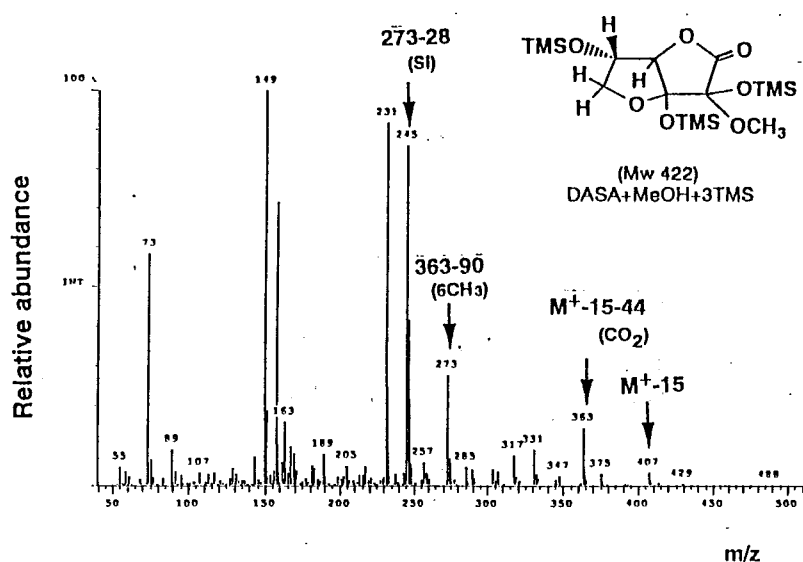


Fig. 3-2 Mass spectrum of main peak of TMS derivative of DASA (RT 16.9 min)

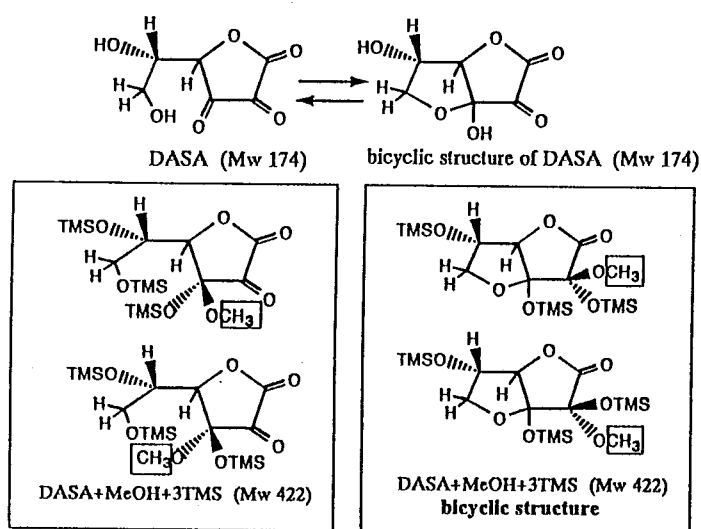


Fig. 3-3 Possible TMS derivatives of DASA solvated with MeOH

その他の生成物として、RT 7.8分のピークが、THLの標品のTMS誘導体とGCのRTとそのマススペクトルが標品及び文献記載[135, 136, 138]のものと一致した。このピークのマススペクトルと推定フラグメンテーションをFig. 3-4に示す。この分子イオンピークはm/z 262に現れ、これより2, 3-di-O-trimethylsilyl-L-threono-1, 4-lactoneであると推定された。フラグメントイオンのうちm/z 247はM⁺-15、m/z 116はM⁺-2TMS、m/z 131及び101についてはFig. 3-4に示すような経路で開裂していくものと考えられる。なお主要ピークであるm/z 45, 59, 73, 75, 147はTMS由来または糖質のTMS化物に共通するピークであり[139, 140]、TMS及びそのフラグメントまたは転位反応により生成したTMSエーテルであると考えられる。(Fig. 3-5参照)

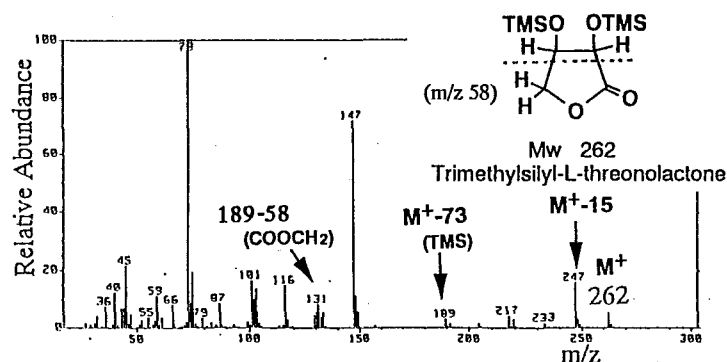


Fig. 3-4 Mass spectrum of TMS derivative of THL (RT 7.8 min)

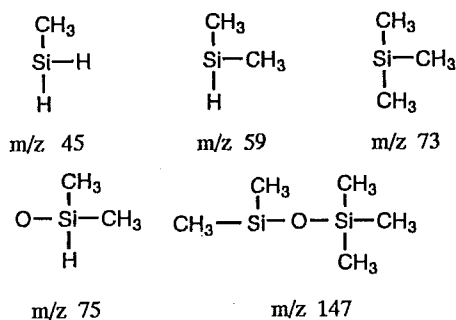


Fig. 3-5 Fragments of TMS

TMSI-Hは比較的穏やかなTMS試薬であるので、この試薬を用いてTMS化反応を行うと水酸基はTMSエーテルになるがカルボキシル基は反応しにくいいため、酸を揮発性誘導体にするのが難しく、反応生成物のうち水酸基を持たない酸についての情報が得られなかった。そこでさらに強力なTMS化試薬のひとつであるMSTFAを用いて反応生成物のTMS化を行った。そのGCクロマトグラムはFig. 3-6に示すとおりで、RT 20.5分のピークがOXAの標品のTMS化誘導体のピークと保持時間が一致した。さらにGC-MS分析の結果、マススペクトルも標品のそれと一致した。(Fig. 3-7参照) 分子イオンピークは出ていないが、スペクトルは文献記載のもの[135,136]と一致し、 m/z 219は M^+-15 であると考えられ、分子量から1,2-di-trimethylsilyl-oxalateであると推定された。

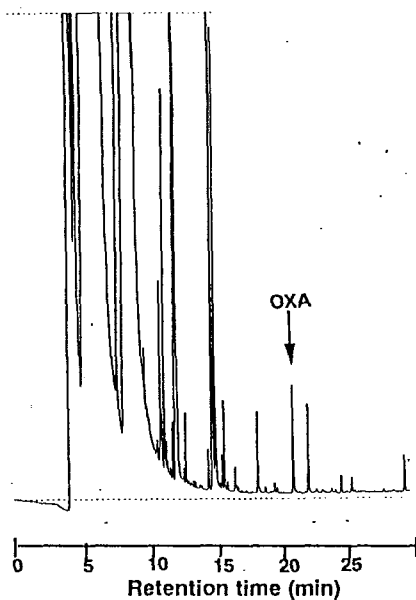


Fig. 3-6 Gas chromatogram of TMS derivatives of ASA oxidation products in MeOH

Reaction time ; 60min
TMS reagent ; MSTFA

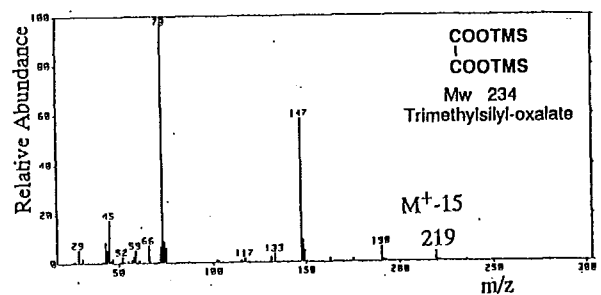


Fig. 3-7 Mass spectrum of TMS derivative of OXA

なお、これらの化合物が濃縮やTMS化などGC分析のための前処理操作によって生じたものでないことを確認するために、酸化反応時間 0分間の試料につき濃縮、乾固その他同様の操作を行ってGC分析を行ったが、ASAのTMS化物以外に顕著なピークは認められなかった。従ってこれらの化合物はASAの酸化反応による生成物であることは間違いないと考えられる。

以上の結果から、ASAをメタノール中で三重項酸素により酸化すると、一重項酸素による場合と同じ生成物が生じることが認められた。この事実はFooteら[97, 98]によって報告されたASAの一重項酸素による酸化と類似の反応が、自動酸化、つまり三重項酸素による酸化の際にも起こる可能性を支持するものである。すなわちメタノール中でASAは三重項酸素により酸化されるとASAのC(2)に酸素分子が結合した形(Scheme1-2参照)(DASAのヒドロペルオキシド)を経由して、一部はMDASAの生成を経て不均化反応によりDASAが生成するが、他方、このASAのC(2)酸素付加物のC(2)-C(3)間の開裂を経て、最終的にOXA及びTHLが生成したという可能性が考えられる。このことはDASAを経由しない新たなASAの酸化経路の存在を示唆するものである。

さらに水中においても同様な反応が起こるか否かについてメタノール中の場合と同条件で調べたところ、その生成量は低いものの、メタノール中と同様にTHL及びOXAの生成は確認された。すなわち、このASAの酸素付加物を経由してTHL及びOXAを生成するASAの酸化反応が食品及び生体系においても起こる可能性が示唆された。

3.3.1.2 デヒドロアスコルビン酸及びジケトグロン酸の酸化反応におけるスレオノラクトン及びシュウ酸の生成

これらC(2)-C(3)の開裂生成物が確かにDASA及びDKGを経由せずに生成

していることを確認するために、まず、DASAのメタノール溶液の酸化反応生成物を調べた。ASAの場合と同濃度である50 μ MのDASAメタノール溶液におけるTHLの生成量を調べた結果をFig. 3-8に示す。DASAからのTHLの生成量はASAからの生成量の約15分の1とかなり小さく、DASAからのTHLの生成反応はASAからの場合に比較して起こりにくいものと考えられる。同じ条件下でOXAは検出できなかった。50 μ MのASAメタノール溶液中のDASA濃度は反応時間60分においても25 μ M以下と考えられるので、25 μ MのDASAメタノール溶液を用いて同様の反応を行ったところ、GC分析によりTHLのピークは検出できなかった。さらに水中でのDASAからのTHLの生成の可能性についても調べたが、THLの生成は認められず、また、OXAのピークもGC分析により検出されなかった。

従ってこのTHL及びOXAがDASAを経由して生成する可能性を完全には否定できないが、ASA酸化反応系でのTHL、OXAの生成に寄与するDASA経路の割合は殆ど無視できる位、小さいと考えられる。また、同様にDKGを用いてメタノール中及び水中での酸化反応を行ったところ、THL及びOXAの生成は認められなかった。これらの実験結果はDASAを経由しないASA酸化経路の存在を支持するものと言えるであろう。

3.3.1.3 メタノール中におけるアスコルビン酸酸化生成物の化学量論的關係

ASAのメタノール中の酸化生成物として認められたもののうち、従来からよく知られており、おそらく生成量も多いと考えられるDASAと本研究で認められたC(2)とC(3)の開裂生成物であるTHLとOXAについて定量を行い、化学量論的な関係を調べた。Table 3-1にASA酸化反応におけるASA残存率とDASA、THL及びOXAの生成量を示す。反応時間30分においてASA残存率は74.7%となり、DASA生成量が初期のASA量の21.0%であるのに

対し、THL及びOXAの生成量はそれぞれ1.8%、1.8%であった。反応時間60分においてもほぼ同様の結果が得られた。この結果からまず、THLとOXAはほぼ等モルで生成することが確認された。このことは、THL及びOXAが一重項酸素とASAとの反応の場合と同様にASAのC(2)酸素付加物を經由してC(2)-C(3)結合の開裂を経て生成するという推定反応機構を支持する結果である。また、THL、OXAの収率はDASAの収率の12分の1を示した。消失したASAの大部分はDASAの生成量で説明でき、THL及びOXAの収率はDASA生成量に比較して小さいものの、THL及びOXAを生成する反応経路はASAの自動酸化反応において量論的にも無視できないことが認められた。

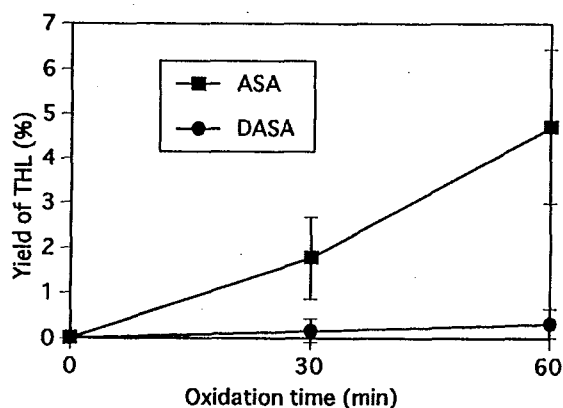


Fig. 3-8 Yield of THL in the autoxidation of DASA in MeOH

Data represent means \pm SD (n=4) and are expressed as a ratio, with the initial amounts of ASA or DASA as 100% (moles).

ASA, DASA concentration; 50 μ M

Reaction temperature ; 25°C

Table 3-1 Remaining ratio of ASA and yield of DASA, THL and OXA in the oxidation of ASA in MeOH

	30 min	60min
Remaining ratio of ASA / %	74.7 \pm 8.1	50.2 \pm 5.5
Yield of DASA / %	21.0 \pm 2.7	42.5 \pm 5.6
Yield of THL / %	1.8 \pm 1.0	4.7 \pm 1.7
Yield of OXA / %	1.8 \pm 0.7	3.1 \pm 0.8

Values represent the means \pm SD (n=4) and are expressed as a ratio, with the initial amounts of ASA regarded as 100% (moles).

3.3.2 種々の条件下でのスレオノラクトンの収率

3.3.2.1 溶媒の種類の影響

メタノール中及び水中においてASAは三重項酸素によってもTHL、OXA等、一重項酸素の場合[97, 98]と同様の生成物を与えることが認められたが、さらに他の溶媒中におけるこのTHL等の生成の有無や、それらの収率について調べた。第II章で述べたようにASAの溶解度も考慮して、エタノール中と非プロトン性溶媒のひとつであるアセトニトリル中でのASAの酸化反応を調べた。各種溶液中でのASAの酸化反応におけるTHLの収率をメタノール中での場合と比較して示したのが、Fig. 3-9である。前述した水中のみならず、アセトニトリル中及びエタノール中においてもTHLの生成は確認された。

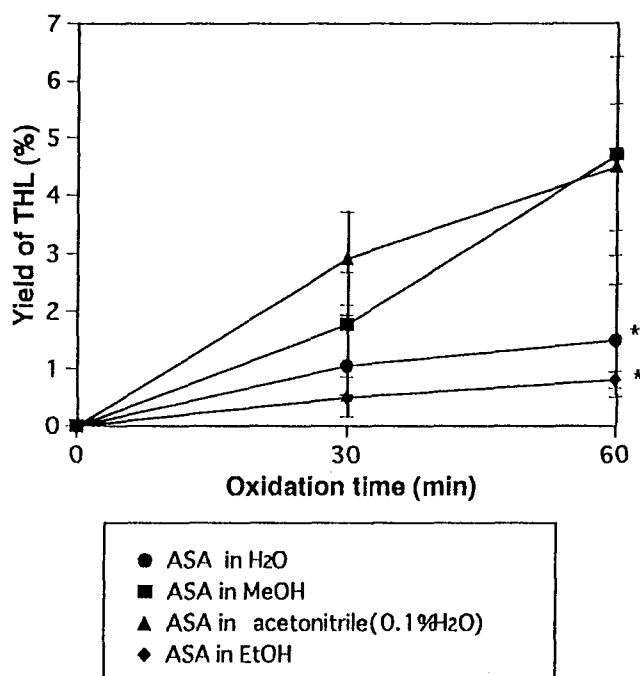


Fig.3-9 Yield of THL In the autoxidation of ASA In various solvent

* $p < 0.05$,
significantly different from ASA in MeOH

Data represent means \pm SD ($n=4\sim6$) and are expressed as a ratio, with the initial amounts of ASA as 100% (moles).

ASA concentration; $50\ \mu\text{M}$ ASA

Reaction solution; H₂O, MeOH, acetonitrile (0.1% H₂O), EtOH

Reaction temperature; 25°C

THLの収率は水中では反応時間60分において1.5%となり、メタノール中の場合の4.7%と比較して約3分の1と生成量は低かった。しかし、第II章で示したようにASA分解率が水中ではメタノール中の約3分の1であった結果を考慮に入れると、水中でのASA酸化反応においてこのTHL等を生成する経路の寄与する割合はメタノール中の場合と大きな差はないものと考えられた。アセトニトリル中では反応時間60分で4.5%とメタノールの場合と同程度であった。ASA分解率において両者が約50%とほぼ同程度であったことから、妥当な結果であると考えられる。すなわち、溶媒の種類に関わりなく、ASAの自動酸化反応においてこのTHL等の生成する反応は起こり、THL生成量は消失したASAの約9%に相当することから、無視できない経路であると推察された。

これに対し、ASA分解率において同じく同程度であったエタノール中のTHL収率が反応時間60分において0.8%となり、メタノールやアセトニトリルの場合よりもかなり低く、水中の場合と比較しても低くなる傾向を示した。そこで、このエタノール中のTHL収率が低くなった理由を考察するために、これら有機溶媒中でのASAの酸化反応について、ASA酸素付加物からのもうひとつのC(2)-C(3)開裂生成物であるOXAの収率を定量し、ASA残存率とTHL収率と併せて示したのが、Table3-2である。その結果、反応時間30分におけるOXAの収率はエタノール中では2.5%となり、メタノール中、アセトニトリル中での収率である1.8%、1.2%と比較してむしろ高い値を示したが、反応時間60分では、いずれの場合もOXAの収率は約3%と、同程度であった。この結果から、エタノール中においてもC(2)-C(3)開裂生成物を生成する反応は起こりにくいわけではなく、メタノール中の場合と同程度起きている可能性が示唆された。なお、このような差異が生じた理由としては、C(2)-C(3)開裂生成物としてTHL以外の生成物が生成している可能性なども考えられるが、ASAのエタ

ノール中での分解生成物のGC分析の結果からはメタノール中で認められた生成物以外に別の生成物は検出できなかったため、さらに検討が必要である。

以上の結果をまとめると、ASAの自動酸化反応において一重項酸素による酸化と同様の生成物であるTHL等が溶媒の種類に関わりなく生成し、メタノール中においてこのC(2)-C(3)開裂生成物を生じる反応がASA酸化反応に占める割合は約9%であることが示され、ASAの自動酸化反応を理解する上で興味深い反応経路であると考えられる。

Table 3-2 Remaining ratio of ASA and yield of THL and OXA in the autoxidation of ASA in various solvent

	30min			60min		
	MeOH	EtOH	acetonitrile	MeOH	EtOH	acetonitrile
Remaining ratio of ASA	74.7±8.1	67.9±4.7	64.8±2.0	50.2±5.5	53.6±5.1	56.1±1.4
Yield of THL	1.8±0.9	0.5±0.1	2.9±0.8	4.7±1.7	0.8±0.1**	4.5±1.1
Yield of OXA	1.8±0.7	2.5±0.3*	1.2±0.6	3.1±0.8	2.9±0.2	3.4±1.1

*; p<0.01, **; p<0.05, significantly different from ASA/MeOH

Values represent means ±SD (n=4) and are expressed as a ratio, with the initial amounts of ASA regarded as 100%.

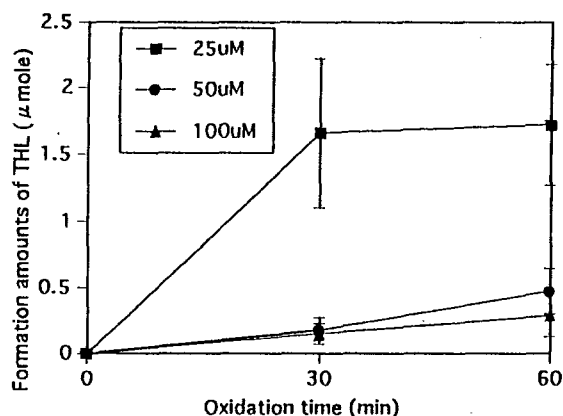
Concentration of ASA ; 50 μM

Reaction solution ; MeOH, EtOH, acetonitrile(0.1% H_2O)

3.3.2.2 アスコルビン酸初濃度の影響

ASAの酸化経路のうち、THL等を生成する反応の起こりやすさを調べるためにASA初濃度を100 μM、50 μM、25 μMと変えて、ASAのメタノール中での酸化反応を行い、THLの収率を定量し比較した結果をFig. 3-10に示す。上のグラフが反応開始時のASA10 μmole当りでTHLの収率を比較したもので、反応時間60分間において、50 μMにおけるTHLの生成量は100 μMの場合の約1.6倍となり、25 μMについては100 μMの場合の約6倍を示した。また、25 μMについて反応時間30分と60分の場合で大きな差は認め

られなかった。しかしながら反応液200ml当たりでの消失したASA量とTHL生成量との対応を考えてみると、消失したASA量はいずれの濃度においても約5 μ moleであったが、THL生成量は100 μ M、50 μ M、25 μ Mについてそれぞれ0.57 μ mole、0.47 μ mole、0.86 μ moleを示した。(Fig. 3-10参照)すなわち、THL生成経路がASA酸化経路に占める割合は、ASA初濃度25 μ Mの場合の方が100 μ M及び50 μ Mの場合よりも大きい傾向が認められた。この結果は、第II章で述べたようにASAのメタノール溶液のそれぞれの吸収極大は100 μ M及び50 μ Mにおいては約246nmであり、ASAはほとんど非解離型として存在すると考えられるのに対し、25 μ Mにおいてはその吸収極大は約254nmとなり、ASAの解離型の存在を示唆させる結果であったことに起因しているものと推察された。すなわち、ASAの非解離型よりも解離型の方がこのTHL生成反応が起こりやすいものと考えられた。



Data represent means \pm SD (n=4~5) and are expressed as formed amounts per 10 μ mole of ASA (initial amount).

Effect of initial concentration of ASA on the degradation amounts of ASA and yield of THL

	degraded ASA (μ mole)	formed THL (μ mole)
25 μ M ASA	4.72 \pm 0.05	0.86 \pm 0.22
50 μ M ASA	4.98 \pm 0.05	0.47 \pm 0.17
100 μ M ASA	4.61 \pm 0.12	0.58 \pm 0.32

The reaction was carried out at 25°C for 60min. Data represent means \pm SD and are expressed as degraded and formed amounts per 200ml of reaction mixture.

Fig. 3-10 Yield of THL In autoxidation of various concentration of ASA

Reaction solution ; methanol
Reaction temperature ; 25°C

3.3.2.3 温度及び光の影響

Fig. 3-11はTHL生成経路への温度の影響について調べた結果を示す。40℃で反応した時の反応時間60分におけるTHL収率は8.4%を示し、25℃の場合の4.7%に比較してかなり高い傾向を示したが、有意な差は認められなかった。THL収率が高くなった理由としては温度を上昇させることにより、その熱エネルギーによってASAと酸素分子が反応しやすくなったことがまず考えられる。また、第I章のScheme1-2で示したようにASAと一重項酸素との反応においてASAのC(2)酸素付加物のC(2)-C(3)炭素結合が開裂する時に熱エネルギーが必要であることから考えて、ASAの自動酸化反応においても反応温度を上昇させることにより、C(2)-C(3)開裂生成物であるTHLの生成量が高くなる傾向を示したものと推察された。

3.3.1.1においてメタノール中でのASAの酸化反応で、THLとOXAが生成したことを示したが、この反応は通常の蛍光灯下で行ったが、光の影響を調べるため光を遮断して酸化反応を行った結果をFig. 3-12に示す。その結果、THL収率は光を遮断した場合には反応時間30分で1.5%、反応時間60分では2.1%となり、通常の蛍光灯下の場合に比較してやや小さい傾向が見られたが、有意差は認められなかった。Kwonら[97, 98]の光酸素化反応では光増感剤を用いてキセノンランプ等で光を照射して酸素を励起させて反応を行っている。しかしながら、本研究では光を完全に遮断してもTHLの生成が認められたことと、ここにはデータを示さないがOXAの生成もGC-MS分析により確認されたことから、このTHL、OXA生成反応系には光が特に必要でないことが示唆された。三重項酸素が蛍光灯の光や太陽光により一重項酸素へ励起されてTHL等が生成された可能性は極めて低く、三重項酸素によってもASAからTHL及びOXAが生成することが確認された。

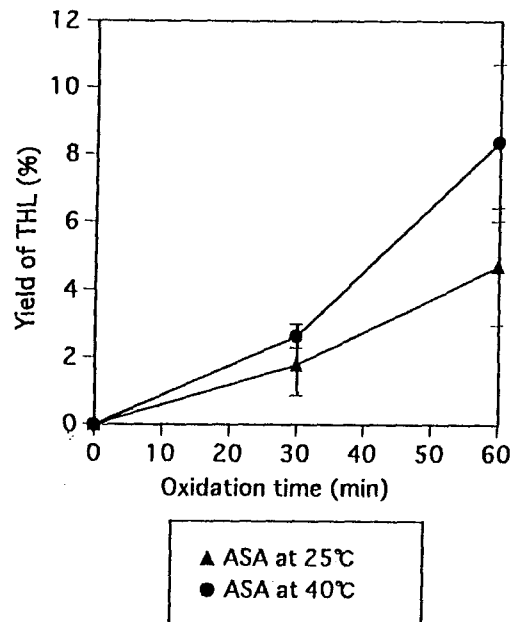


Fig. 3-11 Effect of temperature on the yield of THL

Data represent means \pm SD (n=4) and are expressed as a ratio, with the initial amounts of ASA as 100% (moles).
 ASA concentration ; $50 \mu\text{M}$
 Reaction solution ; MeOH

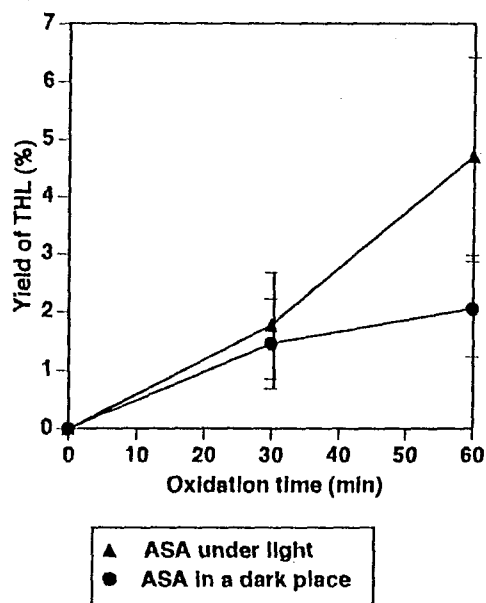


Fig.3-12 Effect of light on the yield of THL

Data represent means \pm SD (n=3~ 4) and are expressed as a ratio, with the initial amounts of ASA as 100% (moles).
 ASA concentration ; $50 \mu\text{M}$
 Reaction solution ; MeOH

3.3.2.4 アスコルビン酸の溶液中での存在形態の影響

50 μ MのASAメタノール溶液はUV吸収スペクトルから判断して非解離型をとっていると考えられるが、同じ濃度でのASAの解離型（モノアニオン）の挙動を調べるためにASAのナトリウム塩（ASA-Na）を用いて同様の反応を行い、THLの収率を測定し、非解離型の場合と比較した。その結果をFig. 3-13に示す。ASA-Naの場合、THLの収率は反応時間30分で2.0%となり、ASAの場合(1.8%)とほぼ同程度であり、反応時間60分では2.4%とASAの場合(4.7%)よりも低い傾向を示した。この結果は第II章でのASA分解率の結果から考察すると、ASA-Naの方が酸化しやすかったにも関わらず、THLの収率がむしろ低くなってしまい、理解しにくい結果である。そこで、この原因を調べるために、まず、ASAの酸化生成物とASA-Naの酸化生成物のパターンを比較することとした。

Fig. 3-14はASA-Naを用いて酸化反応を行ったときの酸化生成物を非解離型の場合と比較して示した。両方の場合において前述したTHL及びOXA（データを示していない）以外に共通して2つのピーク [ピークA(RT 10.3分)、ピークC(RT 12.4分)]が認められた。これらのピークはASA-Naを用いたASAの解離型の酸化反応において、非解離型の場合と比較して大きいことが特徴的であった。また、非解離型の場合には明確に検出されなかったが、解離型ではこの2つ以外にピークB(RT 11.7分)も顕著なピークであった。これらのピークはリキソン酸など従来報告されている水系での酸化物のTMS誘導体ピークのいずれとも異なることが認められた。

ピークA(RT 10.3分)に相当する化合物のGC-MS分析の結果得られたスペクトルと推定開裂過程をFig. 3-15に示す。分子イオンピークは出ていないが、 $M^+ - 15$ が m/z 351であると考えると M^+ は m/z 366となり、 $C_{14}O_5H_{34}Si_3$ の分子式が推定された。今回の実験データからは異性体についての情報は

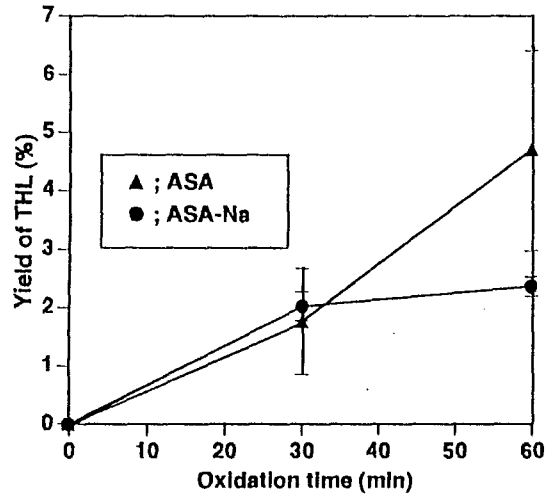


Fig.3-13 Difference of yield of THL between ASA oxidation and ASA-Na oxidation

Data represent means \pm SD (n=3~4) and are expressed as a ratio, with the initial amounts of ASA regarded as 100% (moles).

Concentration of ASA ; $50 \mu\text{M}$

Reaction temperature ; 25°C

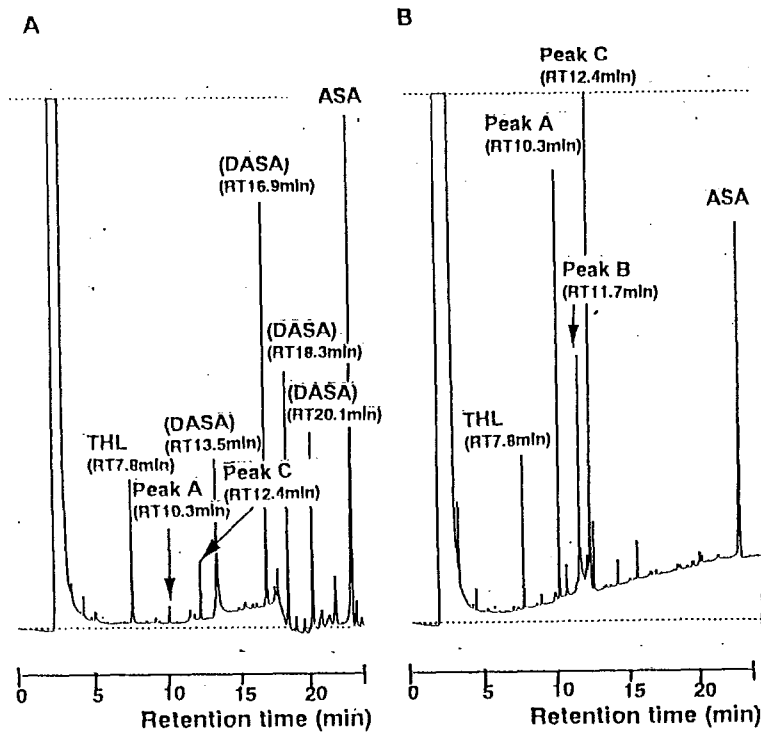
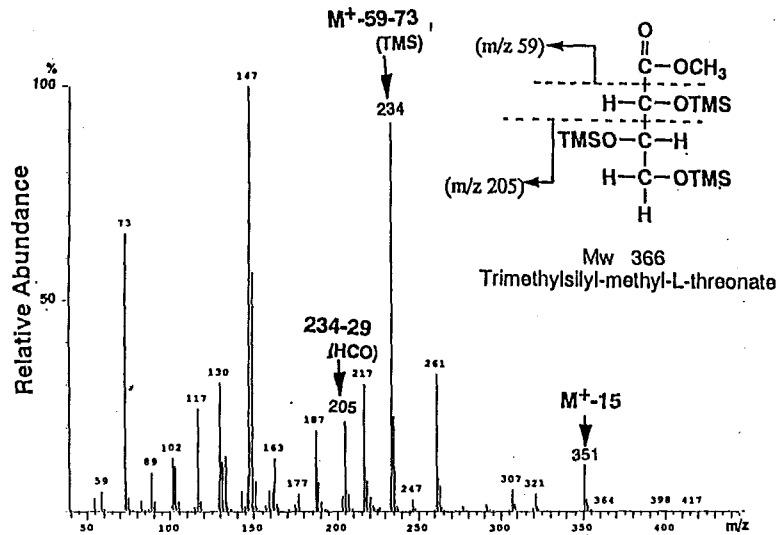


Fig. 3-14 Gas chromatograms of TMS derivatives of ASA oxidation products in MeOH

A ; ASA, B ; ASA-Na
 Reaction time ; 60min
 TMS reagent ; TMSI-H



Mass spectrum of Peak A (RT 10.3 min)

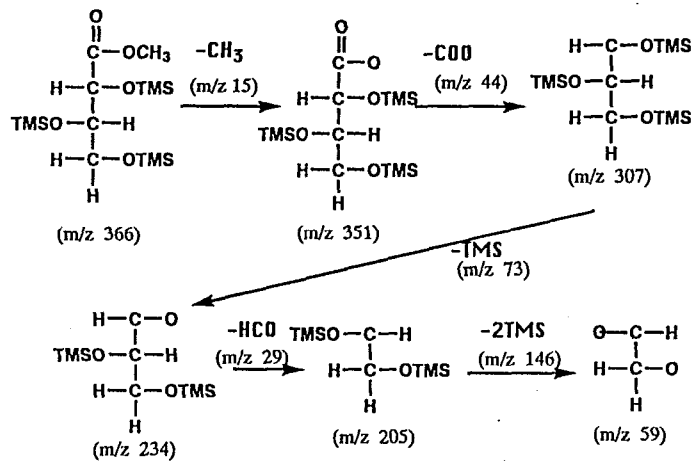


Fig. 3-15 Mass spectrum and possible fragmentation of Peak A (RT 10.3min)

得られないが、反応過程から考えておそらく2,3,4-tri-O-trimethylsilyl-1-methyl-L-threonateであると推定される。メチルエステルはこのASA酸化反応をメタノール中で行ったため生成したと推察された。そこで、溶媒をエタノールに変えてASA-Naの酸化反応を同様に行った。そのGC分析の結果をFig. 3-16に示す。エタノール中の酸化反応においてもメタノール中の場合と同様にASA-Naの酸化生成物として、THL、ピークB(RT 11.7分)、ピークC(RT 12.4分)の他、メタノール中の反応では認められな

かったピークA' (RT 11.3分)が新たに検出された。このピークA'についてGC-MS分析を行ったところ、Fig. 3-17に示すような結果となり、分子イオンピークは出ていないが、 M^+-15 が m/z 365であると考えると M^+ は m/z 380となり、 $C_{15}O_5H_{36}Si_3$ の分子式が考えられた。おそらく2,3,4-tri-O-trimethylsilyl-1-ethyl-L-threonateであると推定された。このようにメタノール中でメチルエステルが、エタノール中でエチルエステルが生成したことから、これらスレオン酸のエステル類はASAの酸化反応過程での反応中間体の溶媒和等により生成したものと推察された。

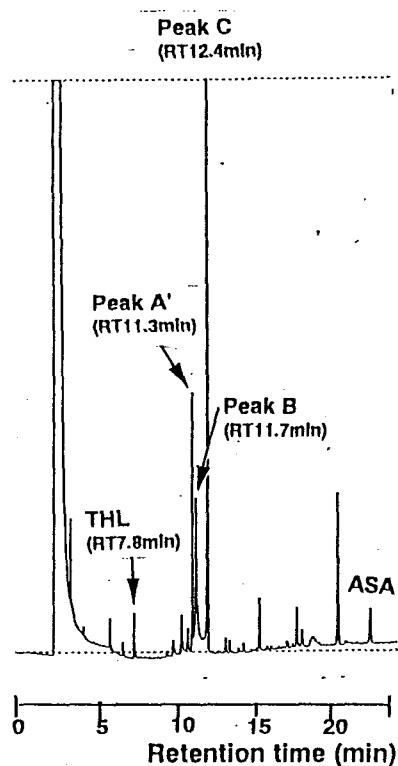


Fig. 3-16 Gas chromatogram of TMS derivatives of ASA-Na oxidation products in EtOH

Reaction time ; 60min
TMS reagent ; TMSI-H

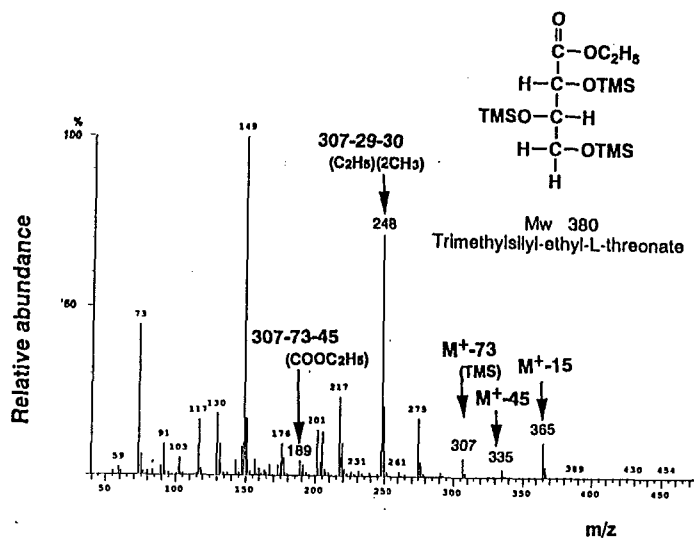


Fig. 3-17 Mass spectrum of peak A' (RT 11.3 min) and possible fragmentation

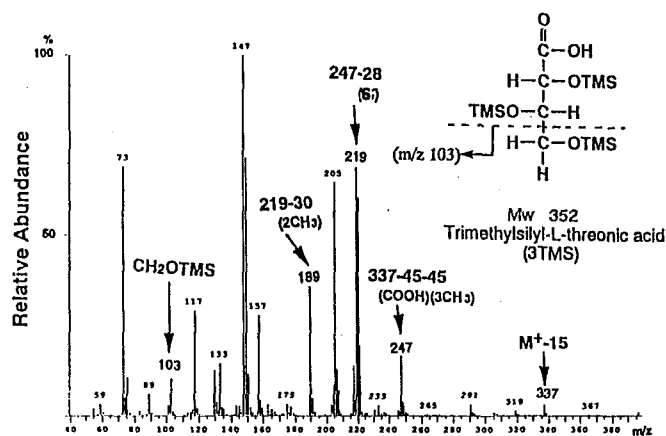


Fig. 3-18 Mass spectrum of peak B (RT 11.7 min) and possible fragmentation

ピークBのマススペクトルとその推定開裂機構はFig. 3-18に示すようになり、m/z 337はM⁺-15と考えられ、ピークBに相当する物質は分子量352の2, 3, 4-tri-0-trimethylsilyl-L-threonic acidであると推定された。本実験ではTMS試薬として比較的反応性の低いTMSI-Hを用いたので、スレオン酸のカルボキシル基はTMS化しなかったものと考えられた。

ピークCのマススペクトルとその推定開裂機構はFig. 3-19に示すよう

になり、 m/z 409は M^+-15 と考えられ、ピークCに相当する物質は分子量424のスレオン酸の全ての水酸基とカルボキシル基がTMS化したもの、すなわち1-trimethylsilyl-2,3,4-tri-O-trimethylsilyl-L-threonateであると推定された。なお、このピークB(3個TMS化したもの)及びピークC(4個TMS化したもの)についてはスレオン酸の標品のTMS誘導体とそれぞれGCのRT及びマススペクトルが一致したのでスレオン酸であると同定された。Fig. 3-19にASAの自動酸化反応におけるこのスレオン酸の推定生成機構を示した。すなわち、スレオン酸はASAの酸化反応においてASAの解離型からC(2)酸素付加物を經由して、さらにこの酸素付加物のC(2)-C(3)結合が開裂したdicarboxyl化合物の生成を経て生成したものと推定された。この推定反応中間体であるdicarboxyl化合物の生成経路には2つの経路が考えられ、一方はC(2)に付加した酸素がC(3)との間にジオキセタン結合を生成し、C(2)-C(3)結合の開裂を経てこのdicarboxyl化合物が生成するが、他方、C(2)酸素付加物にさらにC(3)の水和、脱水酸基を経てC(2)-C(3)結合が開裂してdicarboxyl化合物が生成するものと推察された。これから最終的にスレオン酸とOXAが生成するものと推定された。

この酸化生成物の種類と収率の違いがASA-Naを溶解するためにごく少量(0.1%)加えた水の影響によるものか否かを調べるためにASAメタノール(0.1%水含有)の反応系で酸化を行った。その結果、ASA分解率については第II章ですでに示したようにASAメタノール溶液の場合と大きな差は認められなかった。THL生成量についてもFig. 3-20に示すように反応時間30分で3.5%、反応時間60分で5.1%と、ASAメタノール溶液の場合よりもやや高い傾向を示したが、大きな差が認められなかった。また、酸化生成物の種類についても検討したが、ASAメタノール(0.1%水含有)の場合、ASAメタノール溶液での結果と同様のパターンを示した。

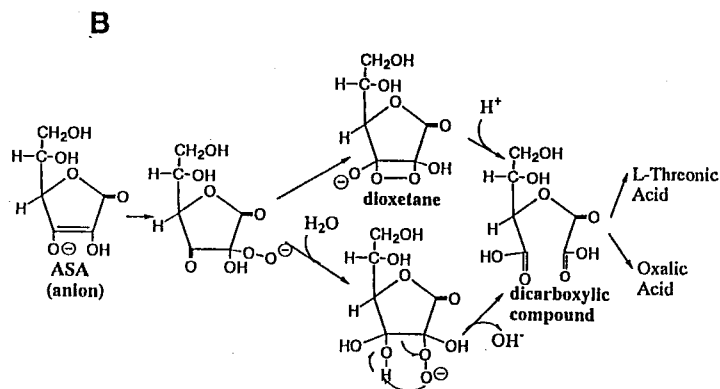
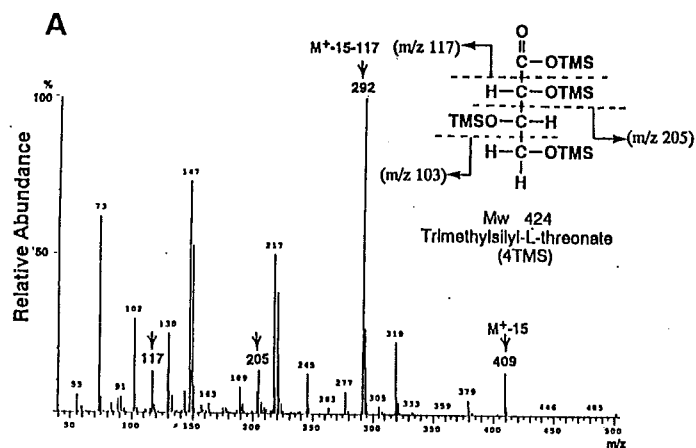


Fig. 3-19 Mass spectrum of Peak C (RT 12.4 min) and possible formation mechanism of L-threonic acid
A ; Mass spectrum of Peak C and possible fragmentation
B ; Possible formation mechanism of L-threonic acid

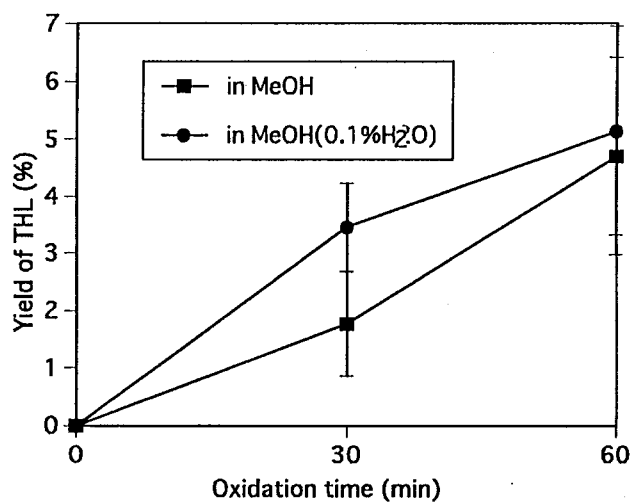


Fig. 3-20 Effect of slight amount of water on the yield of THL

Data represent means \pm SD ($n=4$) and expressed as a ratio, with the initial amounts of ASA regarded as 100%. (moles) ASA; $50 \mu\text{M}$
 Reaction temperature ; 25°C

従って、このごく少量の水の影響は無視できると考えられた。なお、前述したように、このASAメタノール（0.1%水含有）溶液のUV吸収極大は245nmを示し、非解離型をとっていると考えられた。

Fig. 3-13に示すようにASA-Naの場合、ASAの場合に比較してASA分解率は高いにもかかわらず、THLの生成収率は低いのはピークA、ピークB及びピークCにそれぞれ相当するスレオン酸のメチルエステルやスレオン酸が、ASAの場合のTHL及びOXAが生成する反応経路とはやや異なる経路を経由する可能性が高いためと推定される。なお、ガスクロマトグラム上のピークの高さでASA-Naの場合のそれぞれの生成率をASAの場合と比較すると、スレオン酸のメチルエステルの収率はASAの場合の約30倍にも達した。このようにASAの溶液中での存在形態の違いにより反応経路に部分的に違いが生じる可能性が示唆されたが、その詳細についてはさらに詳しい検討が必要であると考えている。

一方、もうひとつのC(2)-C(3)開裂生成物であると考えられるOXAの収率とこの反応系における主要な生成物である推定されるDASAの収量を定量し、ASAのメタノール中での反応の場合と比較して、Table 3-3に示した。反応時間30分において、ASAの残存率が61.3%であるのに対し、DASAの収率はばらつきは大きいものの38.2%となり、消失したASAの大部分をDASAの生成で説明できた。しかし、反応時間30分におけるTHLの収率が2.0%であるのに対し、OXAの収率は3.5%となり、OXAの収率の方がやや高い傾向を示した。さらに、反応時間60分ではTHL、OXAのそれぞれの収率は2.4%、12.7%となり、OXAの収率はTHLの約5倍にも及ぶことがわかった。これはASA-Naの酸化反応においては、ASAの場合とは異なり、C(2)-C(3)開裂生成物として、THL以外の炭素数4の生成物が存在することを示唆するものである。このASA-Naの酸化反応における化学量論と前述した酸化生成物のGC及びGC-MS分析の結果を合わせて考えると、

ASA-Naの場合はC(2)-C(3)開裂生成物としてTHLとOXA以外にTHLに替わるものとしてスレオン酸やスレオン酸のメチルエステル（エタノール溶液中の場合はスレオン酸のエチルエステル）が生成するものと推察された。従って、この場合、C(2)-C(3)開裂生成物の収率を表すものは、THLではなく、OXAの収率であると考えられた。そこで、ASA、ASA-Naのそれぞれの反応におけるC(2)-C(3)開裂生成物の収率を比較すると反応時間60分においてASA及びASA-NaそれぞれのASA残存率は50.2%、42.2%であったが、OXAの収率はそれぞれ3.1%、12.7%となり、ASA-Naの場合のASA分解量はASAの約1.2倍であるのに対して、OXAの収率は約4倍にも達した。

以上の結果より、ASAの解離型の方が自動酸化すなわち、三重項酸素との反応を受けやすく、また、C(2)-C(3)開裂生成物も生成しやすいことが示唆された。

Table 3-3 Remaining ratio of ASA and yield of DASA, THL and OXA

	30min		60min	
	ASA-Na	ASA	ASA-Na	ASA
Remaining ratio of ASA	61.3±6.0**	74.7±8.1	42.2±5.1*	50.2±5.5
Yield of DASA	38.2±9.1**	21.0±2.7	47.3±8.1	42.5±5.6
Yield of THL	2.0±0.3	1.8±0.9	2.4±0.2	4.7±1.7
Yield of OXA	3.5±0.6**	1.8±0.7	12.7±1.7***	3.1±0.8

*; p<0.05, **; p<0.01, ***; P<0.001, significantly different from ASA/MeOH

Values represent means±SD (n=4) and are expressed as a ratio, with the initial amounts of ASA regarded as 100%.
Concentration of ASA, ASA-Na ; 50 μM
Reaction solution ; MeOH

3.3.2.5 金属触媒の影響

第II章においてFe(III)またはCu(II)共存下における純水中及びメタノール中でのASAの酸化反応について調べ、これら微量金属触媒のASAの酸化速度に及ぼす影響が金属の種類及び溶媒の種類により異なることを

示したが、本章ではFe(III)またはCu(II)共存下におけるTHLの収率を定量した。Fig. 3-21は、メタノール中でのASAの酸化反応における金属触媒の影響を調べたもので、左のグラフが第II章で述べたように5 μ M Fe(III)及び0.1 μ M Cu(II)共存のASA残存率に及ぼす影響を表している。金属触媒非存在下(対照)、5 μ M Fe(III)共存下、0.1 μ M Cu(II)共存下のそれぞれの場合において、ほぼ同程度のASA残存率を示す時点でのTHLの収率を定量した。すなわち、全ての場合において約50%のASA残存率を示す時点は対照では反応時間60分、5 μ M Fe(III)共存下では反応時間15分、0.1 μ M Cu(II)共存下では反応時間50分となったので、その時点でのTHLの収率を示したのが右のグラフである。5 μ M Fe(III)共存下では、THLの収率は5.9%となり、対照の4.7%よりもやや高い傾向を示したが、ほぼ同程度であった。これに対し、0.1 μ M Cu(II)共存下では1.1%と、対照と比較してかなり低い値を示した。このようにメタノール中で、Fe(III)及びCu(II)共存下においても金属触媒非存在下の場合と同様に一重項酸素による酸化と同一の生成物が生成したことから、金属触媒存在下においても一重項酸素の場合と同様な反応が起こる可能性が示唆された。しかし、メタノール中で、この一重項酸素の場合と同様な反応の起こる可能性は、Cu(II)共存下ではFe(III)共存下と比較してかなり低いことが推察された。

次に同様にASAの酸化反応における金属触媒の影響を純水中で調べた結果が、Fig. 3-22であり、左のグラフが5 μ M Fe(III)及び0.1 μ M Cu(II)共存のASA残存率に及ぼす影響を表している。同程度のASA残存率、すなわち約85%のASA残存率を示す時点は、金属触媒非存在下(対照)、5 μ M Fe(III)共存下、0.1 μ M Cu(II)共存下のそれぞれの場合において、反応時間60分、15分、5分であり、その時点でのTHLの収率を示したのが右のグラフである。5 μ M Fe(III)共存下、0.1 μ M Cu(II)共存下のそれぞれのTHLの

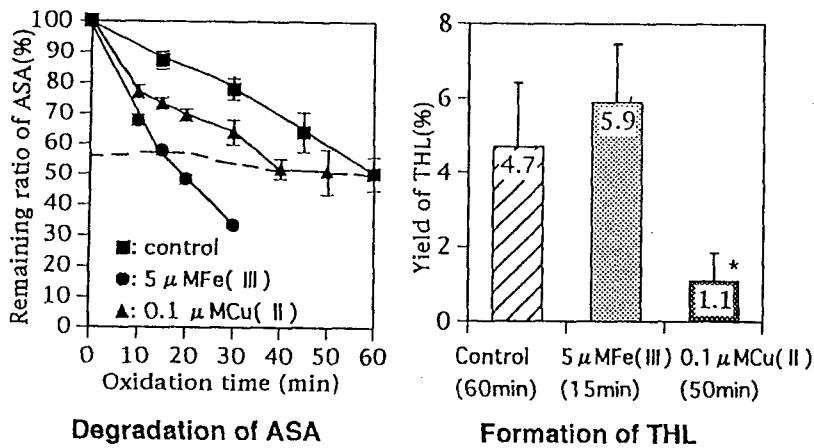


Fig. 3-21 Effect of heavy metal ions on the autoxidation of ASA in methanol solution

* $p < 0.05$,
significantly different from control

Data represent means \pm SD (n=4) and are expressed as a ratio, with the initial amounts of ASA regarded as 100%.

ASA ; 50 μ M

Reaction temperature ; 25 $^{\circ}$ C

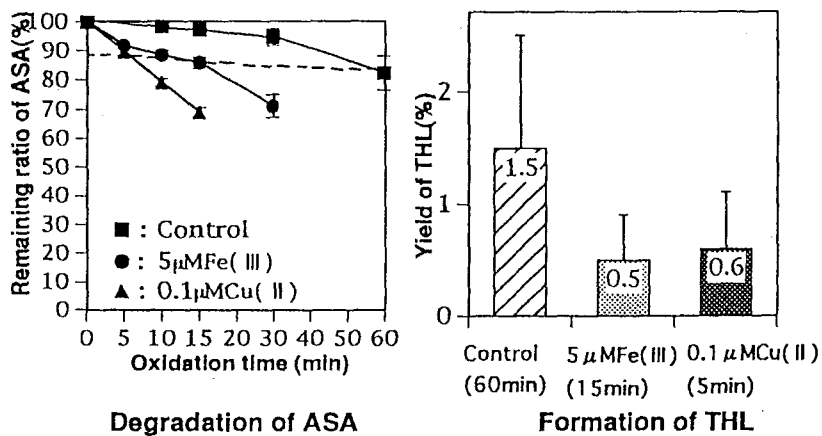


Fig. 3-22 Effect of heavy metal ions on the autoxidation of ASA in aqueous solution

Data represent means \pm SD (n=4) and are expressed as a ratio, with the initial amounts of ASA regarded as 100%

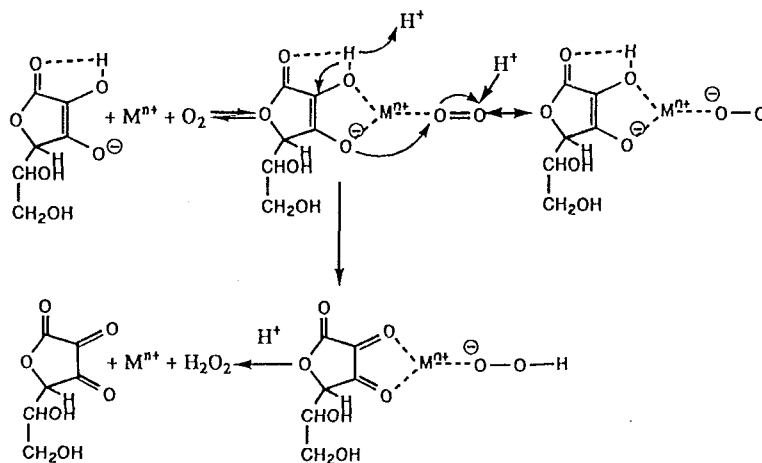
ASA ; 50 μ M

Reaction temperature ; 25 $^{\circ}$ C

収率は0.5%、0.6%を示し、対照の1.5%に比較して2分の1から3分の1の値となった。この結果から、水溶液中においても金属触媒が存在する場合でも一重項酸素による酸化の場合と同様な反応が起こる可能性が示唆された。また、THL等を生成するこの反応は金属イオンにより本質的には促進されていないことも推察された。

水溶液中でのASAの酸化反応における金属触媒の作用機構としては、ASAのエンジオール構造に金属イオンが配位してASAから金属イオンへの電子移動が起こるといわれている。この時、金属イオンに酸素分子が配位すると酸素の一電子還元が起こり、 O_2^- を生成する。すなわち、 $[ASA-M^{n+}-O_2]$ という錯体を形成してASAから酸素分子への電子移動は行われると考えられている[141]。(Scheme3-1参照)しかしながら、本研究により、金属触媒存在下においてもTHLの生成が確認されたことから、ASAが金属イオンとの錯体をし得る条件下におけるASAのC(2)の酸素付加物の生成の可能性が示唆された。THLの収率が、金属触媒非存在下の場合に比較して、同程度あるいは低くなったのは金属イオンとの錯体を形成するとASAのC(2)への酸素分子の付加反応が起こりにくくなるか、あるいは、付加してもC(2)-C(3)結合の開裂反応が起こりにくいという可能性も考えられる。また、ASAの分解率に対して、THLの収率が低かった反応系については、第II章において述べたようにFenton反応により生成した $\cdot OH$ [102]とASAの反応の寄与の可能性も無視できないものと思われる。 $\cdot OH$ とASAとの反応についてはASAのC(2)またはC(3)への付加反応により進行し、MDASAが生成すると考えられている[94]が、その反応生成物については未だ十分解明されていない。従って、THL以外のASAと $\cdot OH$ との反応生成物が生成している可能性も推察される。特に、Fe(III)共存下の場合についてメタノール中と純水中でTHLの収率が非常に異なる結果となったのにはこのASAの酸化反応に対する溶媒の効果が大きいこと

を示唆しているものと思われるが、その詳細については今後さらに検討が必要であろう。



Scheme 3-1 Metal-catalyzed oxidation of ASA

(A.E. Martell, in "Ascorbic Acid; Chemistry, Metabolism, and Uses"⁽¹⁴¹⁾)

第IV章 アスコルビン酸の自動酸化反応機構

4.1 目的

前章まででASAの自動酸化反応、すなわちASAと三重項酸素との反応においても、ASAと一重項酸素との反応[97, 98]の場合と同様な反応生成物、すなわち、THLとOXAが生成することを示した。また、メタノール中でのASAの自動酸化反応において、THL及びOXAの収率はASAの主要酸化生成物であるDASAの約12分の1と少ないものの、無視できない量であり、さらにTHLとOXAがほぼ等モルずつ生成することを示した。このTHLとOXAはKwonら[97, 98]の一重項酸素を用いた研究と同様にメタノール中で生成するばかりでなく、エタノール中、アセトニトリル中や水中においても生成することが認められた。一重項酸素での酸化反応ではTHLとOXAはASAのC(2)の酸素付加物を經由して、C(2)-C(3)結合の開裂を経て生成すると報告されている。そこで、これらの生成物が一重項酸素との反応と同様の反応機構によるものか否かについて検討することとした。しかしながら、Kwonら[97, 98]の報告で提示されているASAのC(2)の酸素付加物をはじめとする反応中間体はいずれも -80°C でのNMR分析により認められており、室温下では非常に不安定であるため、分離・分析することが困難である。そこで、反応中間体についての情報を得るためにまず、計算化学的手法を用いてASAと酸素分子との反応について検討した。さらに、一重項酸素がこのASAの自動酸化反応に関与している可能性を調べるために、一重項酸素の寿命が長いことが知られている溶媒[142, 143]を用いてASAの自動酸化反応を行い、一重項酸素との反応の場合と同一の生成物であるTHLの収率を定量することとした。すなわち、一重項酸素の寿命が長い溶媒としては重水(D_2O)を選び水中(H_2O)での反応の場合とTHLの収率を比較し、一重項酸素の反応への関与の可能性について考察を加えることとした。

ASAの自動酸化経路として一般的によく知られている経路はASAから一電子酸化により、MDASAに酸化され、さらに不均化反応によりASAとDASAが生成するものである。一方、ASAの水溶液中での自動酸化反応過程において O_2^- が生成することが、報告されており[101]、この反応は金属触媒共存の有無に関わらず起こるものといわれている。本研究では、この水溶液中でのASAの酸化反応における O_2^- の生成について追試するとともに、メタノール中の反応においても O_2^- が生成するか否かについて調べることとした。ASAは酸素分子を一電子還元すると O_2^- を生成するとともにMDASAに変化すると考えられている[101]が、その反応機構の詳細は不明な点が多く残されている。そこで、ASAの主要酸化生成物と考えられているMDASAと O_2^- の生成機構についても考察を行うこととした。以上、本章ではASAの自動酸化反応におけるTHL、OXA及びMDASA、 O_2^- の生成機構について解明することを目的とする。

4.2 実験材料と方法

4.2.1 アスコルビン酸の自動酸化反応への一重項酸素の関与の可能性

4.2.1.1 分子軌道法の計算方法

分子軌道法の計算には2.2.3に示した分子軌道法の計算方法に従って行った。

4.2.1.2 重水を用いたアスコルビン酸の酸化反応

4.2.1.2.1 アスコルビン酸の酸化反応

ASAを50 μ Mの濃度で重水(D₂O、Aldrich Chem. Co.)に溶解し、第II章の2.2.1.1の方法に従ってASAの酸化反応を行った。

4.2.1.2.2 アスコルビン酸の残存率の定量

ASAの残存率の定量を2.2.2.1の方法に従って行った。

4.2.1.2.3 スレオノラクトンの定量

重水中でのASA酸化反応におけるTHLの定量は第III章の3.2.5.1の方法に従って、行った。

4.2.2 アスコルビン酸の酸化反応におけるO₂⁻の検出実験

4.2.2.1 水溶液中でのO₂⁻の検出実験

水溶液中でのASA酸化反応系におけるO₂⁻の発生の有無を調べる目的でScarpaらの方法[101]に従い、50 μ M ASA及び2 \times 10⁻⁷M CATを含有する0.07Mリン酸緩衝液(pH7.4)または純水に、1 \times 10⁻⁶M SODが存在する場合と存在しない場合の4通りについて、それぞれ35°Cにおいて酸素ガスを通気しながら、30分間酸化反応を行い、反応液を2倍希釈して265nmでの吸光度の測定によりASA残存量を求めた。試薬、反応条件等は第II章

の2.2.1.5と同様である。

4.2.2.2 メタノール溶液中での O_2^- の検出実験

メタノール溶液中でのASA酸化反応系における O_2^- の発生の有無を調べるためには、ASAのメタノール溶液の酸化反応系にニトロブルーテトラゾリウム(NBT、和光純薬)を $61\ \mu\text{M}$ の濃度で加えて酸化反応を行い、NBTの還元生成物であるブルーホルマザン($\lambda_{\text{max}}=560\text{nm}$)の生成量を560nmにおける吸光度の測定により求め、 O_2^- の生成を調べた[144]。

4.2.2.3 検定法

各有意差の検定はStudentのt-検定により行い、危険率5%以下を有意と判定した。

4.3 結果及び考察

4.3.1 アスコルビン酸の酸化反応における一重項酸素の関与の可能性

4.3.1.1 分子軌道法による検討

ASAの自動酸化反応の反応機構について詳しく調べるために計算化学的手法による検討を行った。ASAの自動酸化反応つまりASAと酸素分子の相互作用につき半経験的分子軌道法のひとつであるMOPACのPM3法を用いて計算を行った。すなわち、Fig. 4-1に示すように、ASAの解離型の2位の炭素原子(C(2))に、ASAのラクトン環の平面に垂直な方向から酸素分子を接近させていった場合について解離型のASAと酸素とをsuper-moleculeとして扱って非制限Hartree-Fock(UHF)法と制限Hartree-Fock(RHF)法で計算した。なお、UHFは α スピン電子と β スピン電子を別々に取り扱う方法で不対電子をもつ開殻分子の計算に用いられ、RHFは α スピン電子と β スピン電子が同じ軌道に存在するという制限を持ち、不対電子を持たない閉殻分子の計算に用いられている[145]。酸素分子については一重項酸素の場合には α スピン電子と β スピン電子の数が等しくすべての軌道に2つずつ電子が入っているので[102]RHFで扱うが、三重項酸素の場合には α スピン電子のほうが β スピン電子より2つ多く、その2つの α スピン電子が1つずつ別々の軌道に入っているのでUHFで計算するのが妥当である。ASAの解離型の最高被占軌道(HOMO)はC(2)に存在することが報告されている[94]が、ASAのC(2)と酸素分子との距離を2.5 Åに固定してUHF(三重項の状態)で計算すると、HOMOはASAのC(2)に存在するのに対し、最低空軌道(LUMO)は酸素分子に存在することが認められた。Fig. 4-2はこのときのASAのC(2)と酸素分子(2つの酸素原子の合計)の正味の電荷の変化を示したもので、酸素分子を3 Å程度に接近させると酸素分子の負電荷が大きくなるのに対し、ASAのC(2)の負電荷は小さくなる傾向が見られ、徐々にASAのC(2)の電子が酸素側に移動していくことが示唆さ

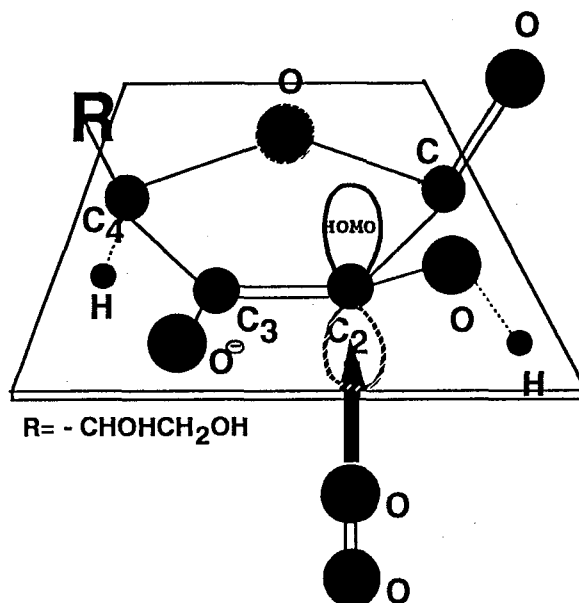


Fig. 4-1 Approaching of oxygen molecule to ASA (anion)

When the oxygen molecule approached the C(2) of ASA (anion), the optimized structures, net charges and heat of formation were calculated by using the PM3 in MOPAC.

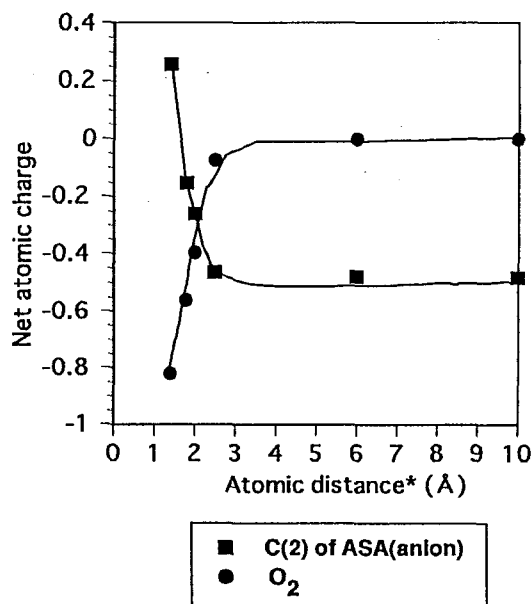


Fig. 4-2 Net atomic charges in various distance between the C(2) of ASA (anion) and oxygen molecule

* Distance between the C(2) of ASA monoanion and the reacting oxygen atom of oxygen molecule
Data represent the net atomic charges of the C(2) of ASA and the oxygen molecule.

れた。このようにASAのC(2)と酸素分子の間には、両者の接近に伴い相互作用が生じることとなるが、一重項酸素とASAアニオンとの場合について調べてみると、最終的に1.42 Åで酸素分子がASAのC(2)に結合するようになり、ASAのC(2)での酸素付加物の生成が計算化学的にも支持された。このASAの酸素付加物のHOMOは酸素分子に、LUMOはASAのC(3)に存在するようになる。また、このときの生成熱についてUHF法とRHF法で計算した結果がFig. 4-3である。その結果、ASAのC(2)と酸素分子の間の距離が約2 ÅくらいまではUHF（三重項）の方が生成熱が低く、安定であるが、それ以上に接近させるとRHF（一重項）の方が安定になり、約1.4 Åで酸素分子がASAのC(2)に結合するようになった。つまり、ASAの解離型に三重項酸素を接近させると、どの時点で変わるかは明らかではないが、ある一定距離からは一重項酸素的な性質を帯びてくるようになり、ASAの酸素付加物が生成する可能性が示唆された。ASAの解離型と酸素分子が十分に離れている時、すなわちASAのC(2)と酸素分子の間の距離が10 Åである時、ASAの解離型と酸素分子とのsuper-moleculeのRHF（一重項）での生成熱は-270.1 kcal/molであるのに対して、UHF（三重項）での生成熱は-292.4 kcal/molとなり、この間のエネルギー差は、22.3 kcal/molであった。酸素分子のスピン状態の変換、すなわち三重項から一重項への励起に必要とされるエネルギーは23.4 kcal/molであるといわれており[45]、この22.3 kcal/molという計算結果はこの値に非常に近いといえる。従って、Fig. 4-3に示すように両者が接近するに従い、三重項酸素から一重項酸素への励起に要するエネルギーは減少する傾向にあり、酸素分子の三重項から一重項への励起はエネルギー的により起こりやすくなるものと考えられ、特に約2 Å以下の非常に接近した場合にはsuper-molecule中の酸素は三重項状態よりも一重項状態として存在する方がより安定であると考えられる。Fig. 4-4はASAの解離型と酸素分

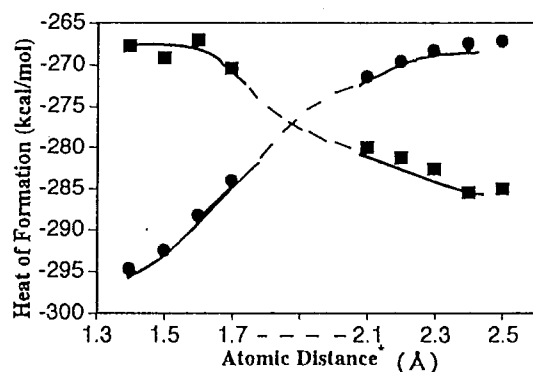


Fig. 4-3 Heat of formation of the super-molecule of ASA anion with oxygen

*distance between the C(2) of ASA monoanion and the one oxygen atom of oxygen molecule. calculated by
 ■ ; UHF-triplet, ● ; RHF-singlet

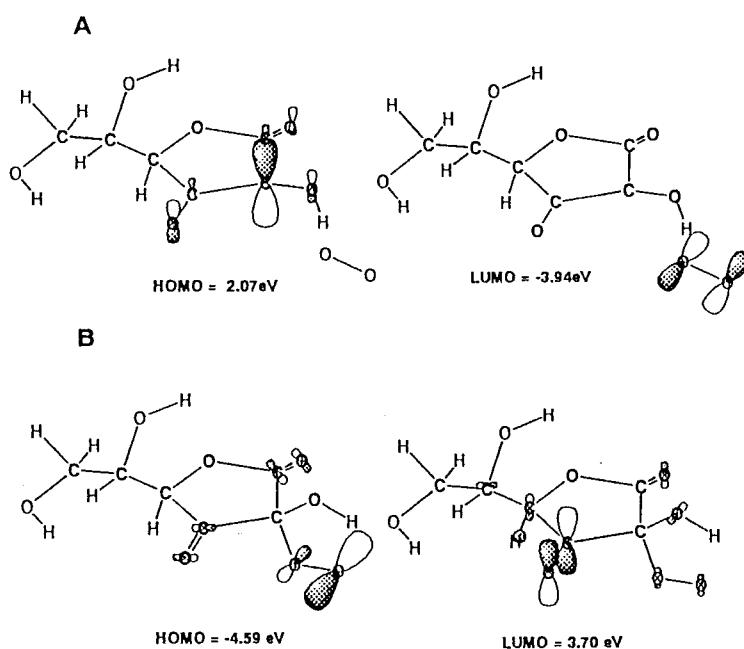


Fig. 4-4 HOMO and LUMO of super-molecule of ASA (anion) with O₂ and C(2) oxygen adduct of ASA (anion)

A ; super-molecule of ASA (anion) with O₂
 (distance between C(2) of ASA and one
 atom of oxygen molecule ; 3 Å)
 B ; C(2) oxygen adduct of ASA (anion)

子が十分離れている時、すなわちASAのC(2)と酸素分子の間の距離が3 Åである時のASAの解離型と酸素分子とのsuper-moleculeと、ASAのC(2)酸素付加物のアニオン型のそれぞれの最高被占軌道(HOMO)及び最低空軌道(LUMO)の各分子軌道とエネルギー値とともに示したものである。ASAが酸素分子と離れている時は、ASAの解離型と酸素分子とのsuper-moleculeのHOMOはASAのC(2)に大きく分子軌道が局在していたが、ASAのC(2)酸素付加物のHOMOでは分子軌道がペルオキシアニオンのひとつの酸素原子に局在するようになり、C(2)にはほとんど存在しないことが認められた。また、ASAの解離型と酸素分子とのsuper-moleculeのLUMOは酸素分子に局在しており、両酸素原子に等しく存在していたが、ASAのC(2)酸素付加物のLUMOではC(3)のカルボニル基に局在するようになった。Fig. 4-5は上図がASAのC(2)酸素付加物のアニオン型の平衡構造と生成熱を、下図が正味の電荷を示す。このように解離型の生成熱は-294kcal/molであったが、非解離型の-269kcal/molに比較して低く安定であると考えられた。正味の電荷はASAのC(2)の電子が付加した酸素分子側に移動し、付加した酸素分子部分が大きく負の電荷を帯びるようになり、しかもペルオキシアニオンの2つの酸素原子は分極して等価ではなくなっていることが認められた。

以上の計算結果から、酸素分子がASAアニオンに非常に接近すると一重項酸素的な挙動を示す可能性が示唆された。すなわち、ASAアニオンに酸素分子が近づくとASAのC(2)と酸素分子間で互いに相互作用を及ぼすようになり、最終的にはASAアニオンと酸素の付加物が生成され、このASAの酸素付加物はエネルギー的にも比較的安定であることが示唆された。これらの計算結果は、ASAの三重項酸素による自動酸化においても一重項酸素による場合と同様の生成物が生じること、さらにASAの酸素付加物を經由したと推定される反応中間体の存在が認められるなど、

第Ⅲ章で述べた実験結果を支持するものである。

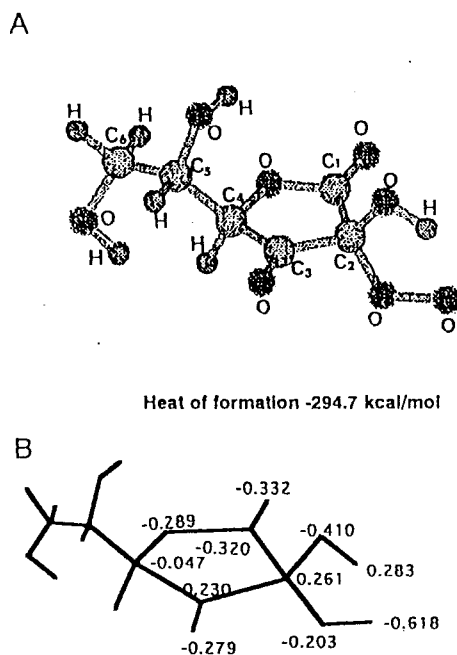


Fig. 4-5 Optimized structure and charge distribution of C(2) oxygen adduct of ASA (anion)

A ; Optimized structure*

B ; Charge distribution

*optimized structure was visualized by use of MOLGRAPH developed by DAIKIN Industries Ltd.

Table 4-1 Lifetime of singlet oxygen in various solvent

Solvent	Lifetime (μ s)	Solvent	Lifetime (μ s)
H ₂ O	3.3	CD ₃ CN	600
D ₂ O	68.0	CHCl ₃	60
CH ₃ OH	5~11.4	CDCl ₃	640
CD ₃ OD	224	CH ₂ Cl ₂	105
CH ₃ COCH ₃	46.5	CF ₃ Cl	1000
CD ₃ COCD ₃	690		
CH ₃ CN	54.4		

(D. Bellus, *Adv. Photochem.*, **11**, 105 (1979)^[142])

M.A.J. Rodgers, *J. Am. Chem. Soc.*, **105**, 6201 (1983)^[143])

4.3.1.2 重水を用いた実験による検討

実験結果からのASAの自動酸化反応における一重項酸素の生成の可能性を検討するために、水中での酸化反応については重水を用いた実験を行った。各種溶媒中での一重項酸素の寿命はTable4-1に示す通りで、水

(H₂O)に比較して一般的に有機溶媒の方が一重項酸素の寿命が長いことが知られている[142, 143]。しかし異なる種類の溶媒では、第II章で述べたように酸素の溶解度に差があり、その影響を受ける危険性もある。従って、ここでは同じ種類の溶媒でも重水素置換溶媒中の方が一重項酸素の寿命が長いという特徴を生かして、重水(D₂O)を選択した。これには、他の重水素溶媒に比較してD₂Oが安価であるとの理由もある。Table4-1に示すように一重項酸素の寿命は水(H₂O)中に比べD₂O中の方が約10倍ほど長い。この両者でのTHL収率を比較した結果をFig. 4-6に示す。D₂O中でのTHLの収率は約60%増加し、5%の危険率で統計的有意差もみられた。なお、ASAの分解率についてはD₂O中での反応の方が分解率がやや大きくなる傾向が見られたが、この2つの条件下で有意な差は認められなかった。従って、D₂O中では一重項酸素の寿命が長いため、一重項酸素による特徴的な分解生成物であるTHLの生成量が高くなったと推察された。すなわち実験結果からもASAの自動酸化における一重項酸素の関与の可能性が間接的ではあるが、示唆された。

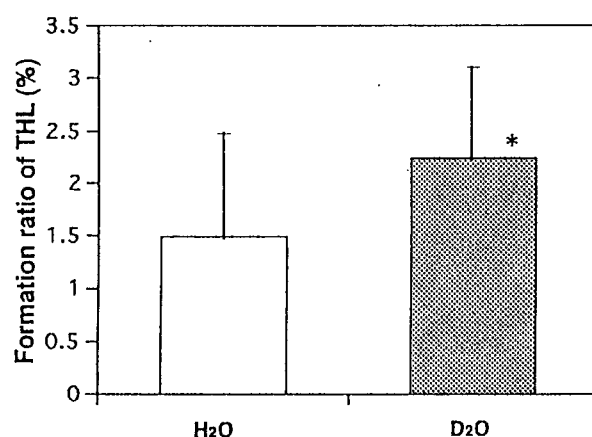


Fig. 4-6 Difference of formation amounts of THL between in H₂O and in D₂O

*; $p < 0.05$, significantly different from ASA in H₂O
 Data represent means \pm SD (n=6) and are expressed as a ratio of THL formed, with the initial amounts of ASA as 100% (moles).

Concentration of ASA; 50 μ M ASA
 Reaction solution; H₂O, D₂O
 Reaction temperature; 25°C
 Reaction time; 60min

4.3.2 アスコルビン酸の酸化反応における O_2^- の生成

4.3.2.1 水溶液中での反応

SODは次のように、スーパーオキシド(O_2^-)を不均化して H_2O_2 に変える反応を触媒する酵素である[146]。



ASAの水中での自動酸化反応において、金属触媒の存在の有無に関わらず、 O_2^- が発生することが O_2^- のスキャベンジャーであるSODの存在の有無によるASAの分解速度の違いからすでに報告されている[101]。すなわち、ASAの酸化の過程で生成した O_2^- がさらにASAと反応していくため、ASAの分解率がSODの存在する場合、SOD非存在下の場合に比較して低くなるというものである。本研究ではScarpaら[101]の方法を若干改変して、酸素ガスを通気して緩衝液及び純水中でのASAの自動酸化反応に対するSODの添加効果を調べた。なお、反応系には第II章で述べたように H_2O_2 はSODの阻害剤として作用することが報告されているので、 H_2O_2 の影響を避けるためにCATを反応系に添加した。Fig. 4-7にその結果を示したが、Aが緩衝液中、Bが純水中の結果を表している。緩衝液中では35°Cで反応を行ったが、純水中では前述したように反応速度が非常に小さいので40°Cで行った結果を示した。ASAの金属触媒非存在下の自動酸化反応において、緩衝液中ではSODの存在しない場合の方が存在する場合に比較して30分でのASA残存率が小さいことが0.1%の危険率で有意に認められた。また水中では60分でのASAの残存率がSODの共存により5%の危険率で有意に増大することが認められた。これらの結果はSODの存在しない場合、ASAが O_2^- を消去していることを示しているものと考えられ、この反応系における O_2^- の存在が示唆された。

このように、水溶液中でのASAの酸化反応における O_2^- の生成は間接的に認められたといえよう。さらにこの反応系における O_2^- の生成を直接確

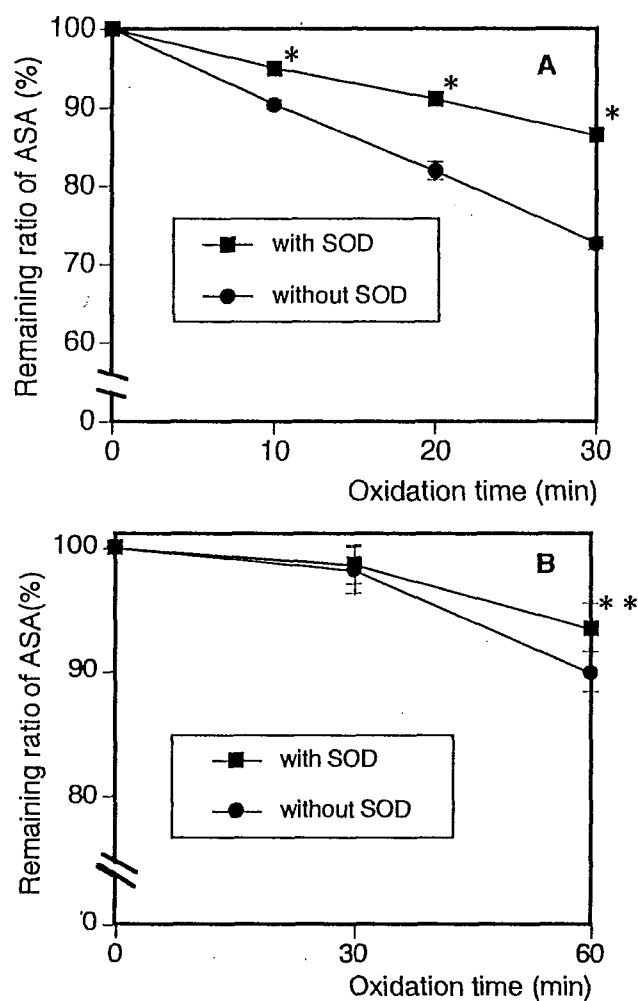


Fig.4-7 Effect of SOD on the autoxidation rate of ASA in aqueous solution

*; $p < 0.001$, **; $p < 0.01$
significantly different from without SOD

The reactions were carried out in 0.07M phosphate buffer (pH7.4) (A) and ultra-refined water (B), containing $50 \mu\text{M}$ ASA and $2 \times 10^{-7}\text{M}$ catalase in the presence of $1 \times 10^{-6}\text{M}$ SOD and in the absence of SOD. Values are means \pm SD.(n=4)

Reaction temperature ; (A) 35°C, (B) 40 °C

認するために、以下に述べるメタノール中での反応系における O_2^- の検出に用いたNBT法[144]による実験を試みたが、ASA初濃度が低濃度であったため、 O_2^- の生成は確認することができなかった。しかし、ASA分解量(絶対量)が高く、従って O_2^- の生成量も高いと推定される、ASA初濃度が本実験系よりも2倍以上高い場合、たとえば1mMの濃度のASA溶液を用いた場合や反応系のpHをpH10に高くした場合には O_2^- の検出を明らかに確認できた。このように本実験系の反応条件下では O_2^- の生成量がNBT法での検出限界以下で、NBT法による O_2^- の生成の確認は難しいと推察された。さらに、本実験条件下でスピントラップ剤として5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide (DMP0)を用いて電子スピン共鳴法(ESR)[147]による O_2^- の検出も試みた。しかしながら、すでに報告されている[148]ように、ASAや没食子酸のような水溶性抗酸化物質には O_2^- 消去作用があり、本反応系で生成した O_2^- も共存するASAと反応してしまうことが懸念されたが、やはり実際にESRによる分析を行ったところ、 O_2^- とDMP0の付加物のシグナルは検出することができなかった。

以上述べたように水溶液中のASAの酸化反応において、間接的ではあるが O_2^- の生成が示唆された。また、ASAの自動酸化反応において酸化の引き金となるASAと酸素分子との反応も確かに起こることが確認された。さらにその結果生ずる O_2^- によってもさらにASAは酸化されていき、ASAの酸化反応へのこの O_2^- による反応の占める割合は無視できないものと考えられた。

4.3.2.2 メタノール中での反応

メタノール中での O_2^- の生成の可能性については、10%メタノール水溶液の場合、水溶液中での反応と同様の方法(4.2.2.1の方法)に従いSODを用いて実験したところ、水溶液の場合と同様にSODの存在しない場合の

方が存在する場合に比較してASA分解率が有意に大きくなり、 O_2^- の生成の可能性が示唆された。さらにメタノール濃度の高い場合についてはSODの他、シトクロムc還元法[149]や乳酸脱水素酵素-NADH法[150, 151]などの O_2^- の検出法は用いることができないので、溶媒中でも測定可能なNBT還元法[144]、テトラニトロメタン還元法[146, 152]が利用可能と考えられる。今回は試薬の入手の容易なNBT還元法を用いることとした。

NBT[nitro blue tetrazolium chloride ; 2, 2'-di-*p*-nitrophenyl-5, 5'-diphenyl-3, 3'-(3, 3'-dimethoxy-4, 4'-diphenylene)-ditetrazolium chloride]は分子量818の水溶性黄色粉末で水中で257nmに吸収極大を示し[153]、 O_2^- などによって還元されると、550nm近辺に吸収極大をもつ青色の不溶性のホルマザンを生成するが、この現象を利用して、 O_2^- 産生細胞の検出などにも用いられている[144]。(Fig. 4-8参照)ただし、 H_2O_2 とも反応し、適当な基質の存在下でxanthine oxidaseなど種々の酸化還元酵素とも反応する点が欠点であるとされている[154]。今回は酵素系などの存在しない単純なモデル系であるので、NBTによりASA酸化反応系での O_2^- の検出が可能であると考えられた。

Fig. 4-9にNBTをメタノール中でのASAの酸化反応に用いた結果を示す。反応開始時、NBTにより黄色であった反応液が約10分後には青紫色に着色し始め、反応時間30分及び60分では560nmでの吸光度は0.04~0.05に上昇した。NBTの還元反応についてはBielskiら[151]によって詳しく調べられており、Fig. 4-10に示すような全体で4電子が授受される反応経路が考えられている。すなわち、NBTのジカチオン型(NBT^{2+})が1電子還元され、NBTラジカル($NBT^{+\cdot}$)が生成し、さらに1電子ずつ還元されてモノホルマザン(MF^+)、モノホルマザンラジカル(MF^{\cdot})を經由してジホルマザン(DF)が生成するというものである。他の反応物質が存在しなけ

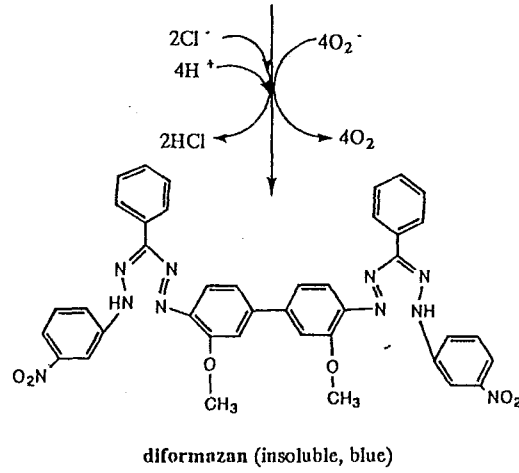
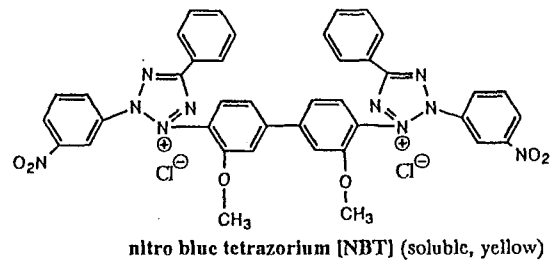


Fig. 4-8 Reaction of NBT with O_2^-

(大柳善彦; 「スーパーオキシドと医学」, 共立出版, p7, (1981))

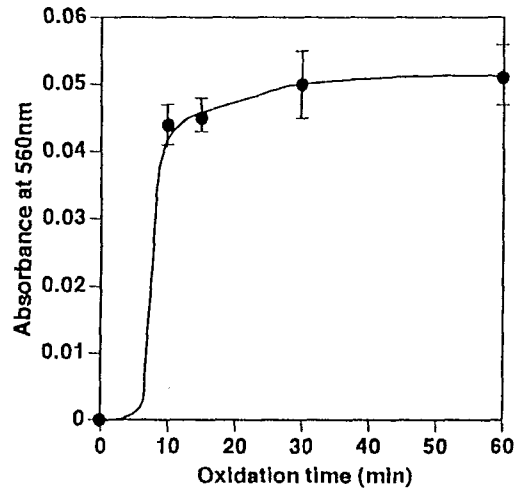


Fig. 4-9 Reduction of NBT in the autoxidation of ASA in MeOH

Values are means \pm SD (n=9).
 ASA concentration ; 50 μ M
 NBT concentration ; 61 μ M
 Reaction solution ; methanol

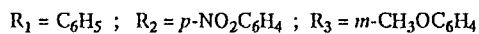
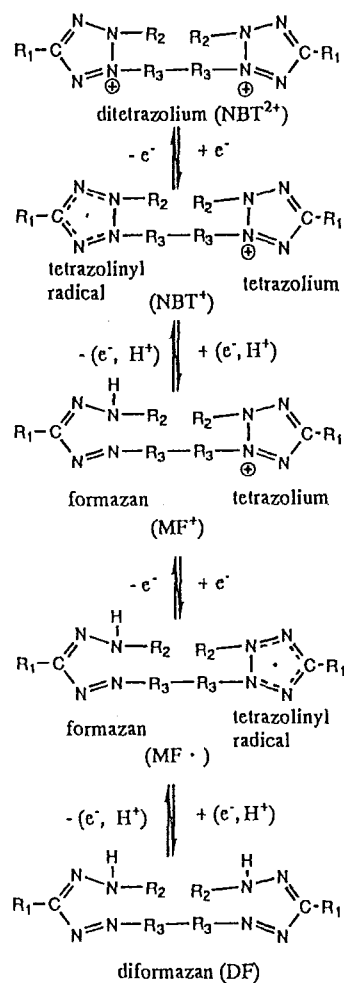


Fig. 4-10 Reaction mechanism of reduction of NBT

(B.H.J. Bielski, G. G. Shiue, and S. Bajuk, *J.Phys. Chem.*, 84, 830 (1980)⁽¹⁵³⁾)

れば、 $\text{NBT}^+\cdot$ は不均化反応によって NBT^{2+} と MF^+ を生成することもある。 MF^+ はpH5.7~11.0の広い範囲でその吸収極大は530nmであり、ジホルマザンと同様、水に溶解しにくいことが明らかになっている。今回の反応

はメタノール中で行っているため、本実験で見られた560nmでの吸光度の増大がホルマザンの生成によるものか否かを確認するために、NBTを含むASA酸化反応後の紫外部・可紫部吸収スペクトルを測定したところ、標品のNBTのメタノール溶液が示す260nm近辺の吸収極大の他、ジホルマザン標品のメタノール溶液の吸収極大(約520nm)も認められ、ASAのメタノール中の酸化反応系におけるホルマザンの生成が確認された。さらにNBTの反応が電子の授受によるものなので、本実験で生成したと考えられるホルマザンが真に O_2^- によるものなのか否か、NBTがASAから電子を受け取った可能性はないのかという点について検討した。

Fig. 4-11はASA酸化反応系の酸素濃度を変化させたもので、反応系に通気する酸素ガスの流速を変えた時のホルマザンの生成量を比較したものである。その結果、酸素ガスの流速が10ml/minから200ml/minに大きくなるに従ってホルマザンの生成量は増加した。また、Fig. 4-12はASA酸化反応系におけるASA濃度を変えた場合のホルマザン生成量を示したもので、ASA濃度が低いほどホルマザンの生成量は高くなり、500 μ Mの濃度のASAを用いた場合、ホルマザンの生成は検出されなかった。しかし、第II章で示したように反応時間60分においてASA残存率は86.09%となり、500 μ MのASAメタノール溶液においても確かにASAの酸化は認められた。ホルマザンの生成が見られなかったのは残存するASAがNBT(約60 μ M)に対して非常に高濃度なため、生成した O_2^- がNBTでなくASAと反応してしまったのではないかと考えられる。以上の結果より、本実験で認められたホルマザンの生成はASAにより直接還元されたものではなく、ASAの自動酸化反応の過程で生成した O_2^- によるものと考えるのが妥当であると思われる。従ってメタノール中のASAの自動酸化反応系においても O_2^- が生成すると推察された。

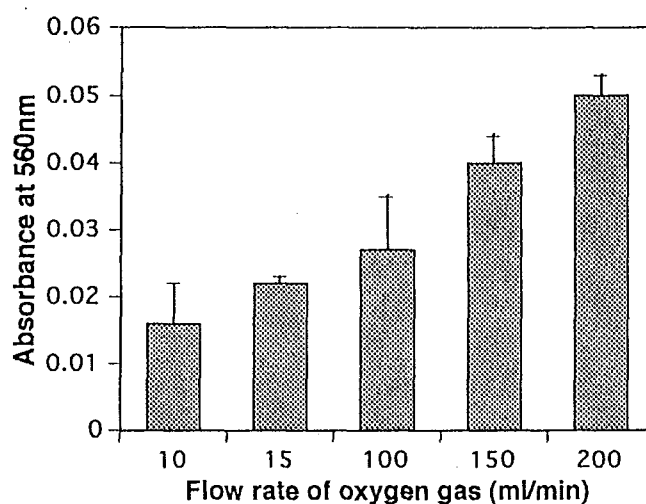


Fig. 4-11 Effect of flow rate of oxygen on the reduction of NBT In the autoxidation reaction of ASA

Data represent means \pm SD (n=4).
 Concentration of ASA; 50 μ M ASA
 Reaction solution ; methanol
 Concentration of NBT; 61 μ M NBT
 Reaction temperature ; 25°C
 Reaction time ; 30min

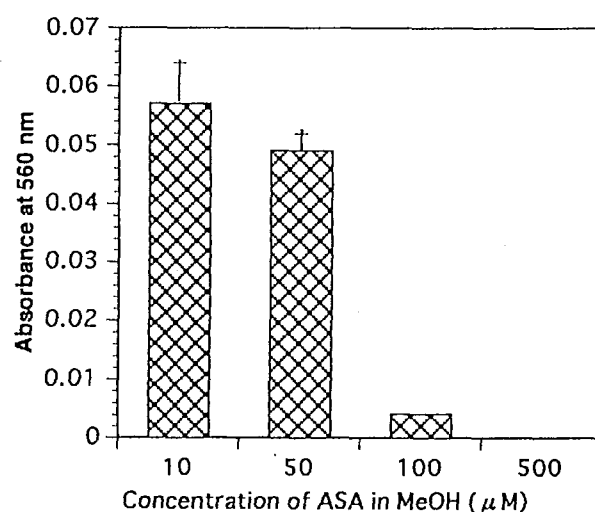
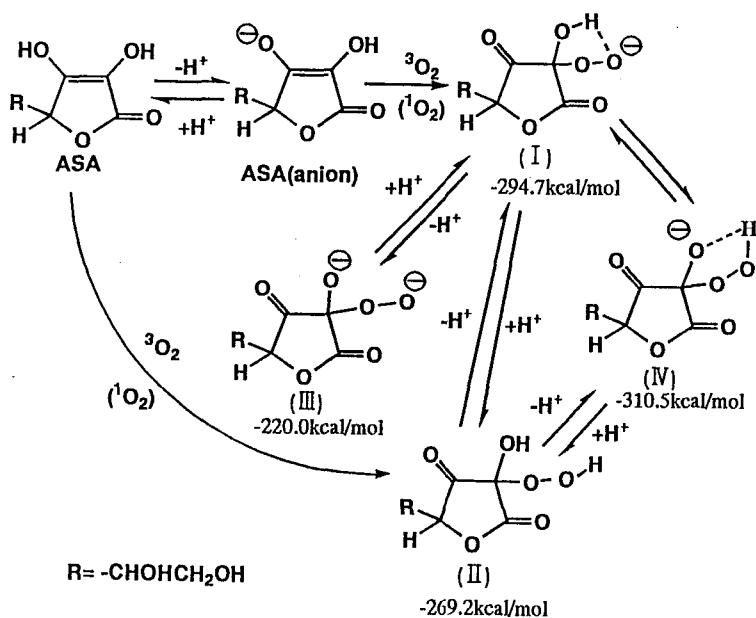


Fig. 4-12 Effect of ASA concentration on the reduction of NBT in ASA autoxidation reaction

Data represent means \pm SD (n=4).
 Concentration of ASA ; 10 μ M, 50 μ M, 100 μ M, 500 μ M
 Reaction solution ; methanol
 Concentration of NBT ; 61 μ M NBT
 Reaction temperature ; 25°C
 Reaction time; 30min

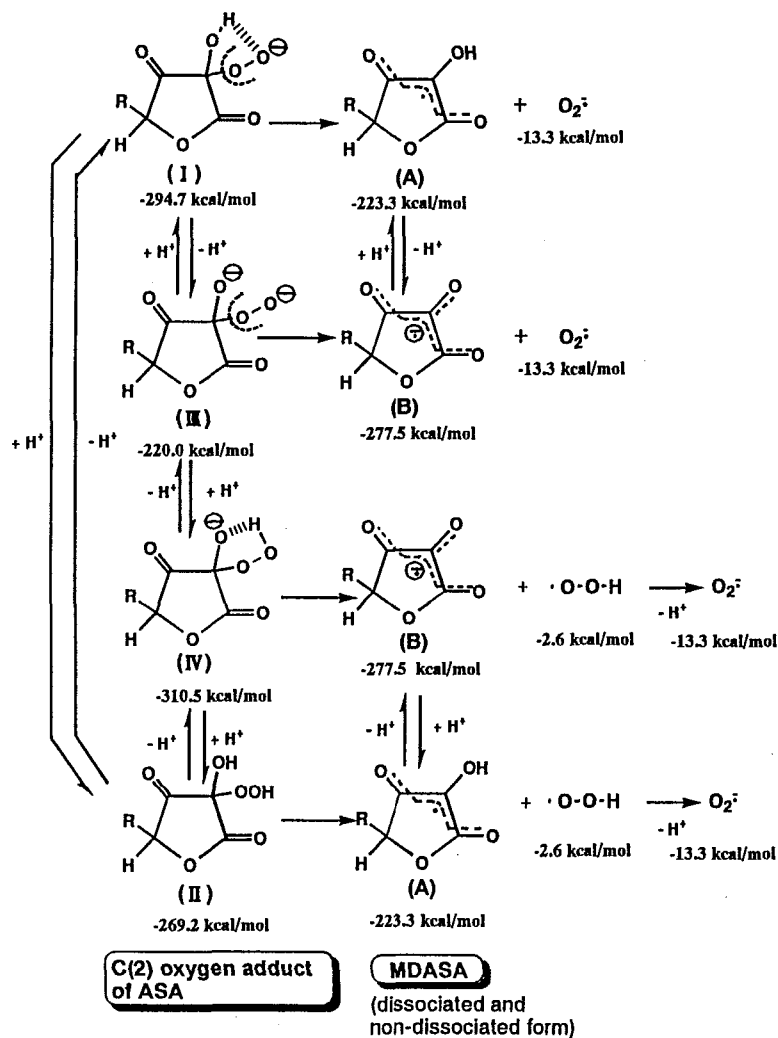
4.3.2.3 分子軌道法による検討

4.3.1.1のFig. 4-4で示したように、ASAのC(2)酸素付加物のアニオン型は付加した酸素分子の部分の正味の電荷が-0.203、-0.618と強く負の電荷を帯びており、この付加物から O_2^- の脱離が可能であることを示唆している。Scheme4-1にASAと酸素分子が反応した際生じると考えられるASAのC(2)酸素付加物の可能な種々の存在形態とそれぞれのMOPACのPM3法により計算した生成熱を示した。今回はより反応しやすいASA（アニオン）と酸素分子について計算を行ったが、ASA（アニオン）での反応の場合生成すると考えられるペルオキシアニオン型(I)と異なり、ASAの非解離型の場合はASAの酸素付加物の非解離型(II)が中間体として生成すると考えられる。前述したようにそれぞれの生成熱はペルオキシアニオン型が-294.7kcal/molであるのに対し、非解離型が-269.2kcal/molとなり、ペルオキシアニオン型の方が安定であると考えられた。(Scheme4-1参照) この2つの存在形態以外にもオキシドペルオキシジアニオン型(III)やオキシドアニオン型(IV)が考えられ、オキシドアニオン型(IV)はその生成熱が-310.5kcal/molとこの4つの形の中で最も安定であった。



Scheme 4-1 Structures and heat of formations of some possible reaction products of ASA with oxygen

次に、Scheme4-2にASAのC(2)酸素付加物の可能な種々の存在形態からの O_2^- の生成機構を示す。ASAの酸素付加物（ペルオキシアニオン型）（I）及びMDASAの非解離型（A）のそれぞれの生成熱は -294.7kcal/mol 、 -223.3kcal/mole となり、ASAの酸素付加物（ペルオキシアニオン型）から O_2^- の脱離の可能性についてはMOPACのPM3法による計算によりエネルギー的にもASAの酸素付加物のアニオン型からの O_2^- の脱離は不可能ではないとの結果が得られた。このMDASAの非解離型は容易に解離し、よりエネルギー的に安定な解離型（B）（生成熱； -277.5kcal/mol ）として存在することが知られている。ASAの酸素付加物からの O_2^- の脱離の反応経路としては、ASAの酸素付加物（ペルオキシアニオン型）（I）からまず O_2^- の脱離が起きてから生成したMDASA（A）が解離する経路と、ASAの酸素付加物（ペルオキシアニオン型）（I）からさらに解離して酸素付加物のオキシドペルオキシジアニオン型（III）に変化してから O_2^- の脱離が起こる経路と2通り考えられるが、MDASA（非解離型）（A）とASA酸素付加物（ジアニオン型）（III）のそれぞれの生成熱に大きな差がないことから、両者の反応経路の可能性が推察された。一方、ASAの非解離型の場合生成すると考えられるASAの酸素付加物の非解離型（II）については、ヒドロペルオキシラジカル（ $\cdot OOH$ ）の形で脱離するものと考えられ、この場合、ASAの酸素付加物の非解離型（II）から解離したオキシドアニオン型（IV）の生成熱は -310.5kcal/mol となり、酸素付加物の非解離型（II）から直接 $\cdot OOH$ が脱離したMDASA（非解離型）（A）の生成熱 -223.3kcal/mol よりかなり低く安定であることから、前者のまずオキシドアニオン型に解離してから $\cdot OOH$ が脱離する反応経路の可能性の方が高いのではないかと推定された。この $\cdot OOH$ は不安定であるので容易に解離して O_2^- になるもの[102]と考えられ、結果的にはASAの非解離型の自動酸化反応においても解離型の場合と同様に O_2^- が生成するものと推察された。



Scheme 4-2 Possible formation mechanism of $O_2^{\cdot -}$ from C(2) oxygen adduct of ASA

4.3.3 アスコルビン酸の自動酸化反応機構

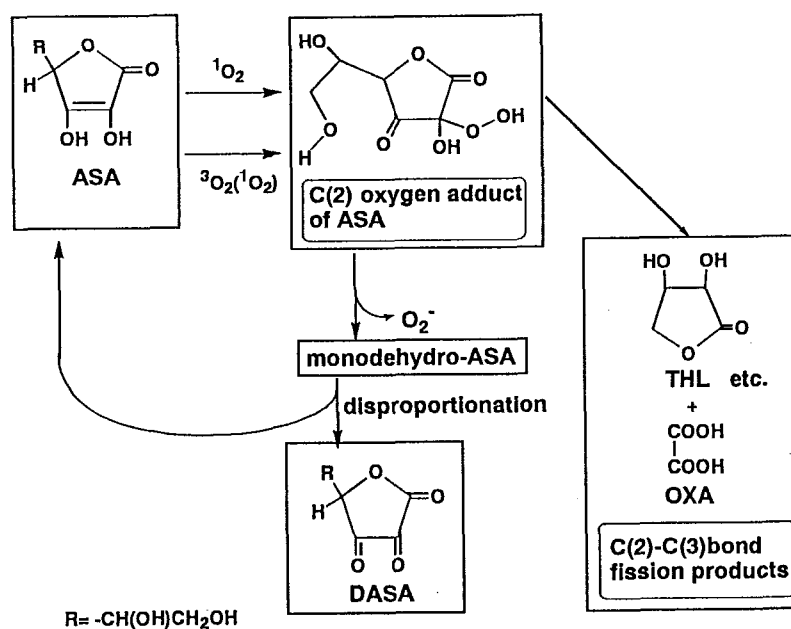
以上、本章において述べたように、ASAの自動酸化反応においてASAの一重項酸素による酸化反応の場合と同様の生成物が生成する反応機構については、MOPACのPM3法による計算結果でASAに酸素分子が接近すると一重項酸素的挙動を示すようになることと、重水を用いた実験結果からこの

ASAの自動酸化反応への一重項酸素の関与の可能性が示唆された。従ってASAと一重項酸素との反応と同様の反応経路を経由しているのではないかと推察された。すなわち、ASAのC(2)酸素付加物を経由してC(2)-C(3)の開裂を経て第III章においてASAの酸化生成物として確認されたTHL、スレオン酸のメチルエステル、スレオン酸のエチルエステル、スレオン酸、OXAが生成するものと考えられた。さらに、第III章において、ASAのメタノール中での酸化反応での化学量論の結果からTHLとOXAがほぼ等モルずつ生成することが示された。この結果はTHLとOXAがASAのC(2)酸素付加物のC(2)-C(3)の開裂を経て生成するという推定反応機構を支持するものである。

また、ASAの自動酸化反応における O_2^- 生成の反応系路についてはASAのアニオンから1電子、酸素分子へ受け渡すことにより O_2^- とMDASAが生成すると考えられてきているが、電子授受機構の詳細はこれまで解明されてこなかった。本研究ではASAの自動酸化反応における O_2^- の生成が水溶液中のみならず、メタノール中においても確認することができた。本研究により得られた実験及び計算結果から、次のような O_2^- とMDASAの生成機構が考えられる。すなわち、まずASAのC(2)での酸素付加物である中間体の生成の可能性が示唆されたことから、このASAの酸素付加物から O_2^- が脱離してMDASAが生成し、さらに不均化反応によりDASAとASAが生成するものと推定された。ASAの酸素付加物から O_2^- が脱離の可能性についてはMOPACのPM3法による計算によりASAの酸素付加物のアニオン型からの O_2^- の脱離がエネルギー的に可能であるとの結果が得られ、この推定反応機構を支持する結果である。

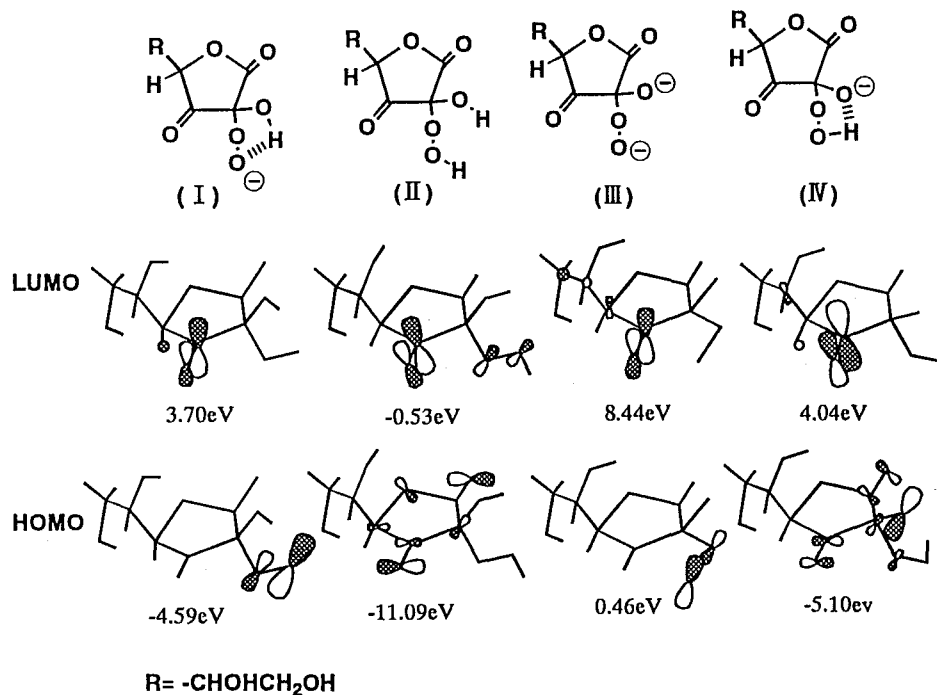
以上まとめると、Scheme4-3に示すような推定反応機構が考えられる。すなわち、ASAは三重項酸素により酸化される際に、一重項酸素の場合と同様にASAのC(2)に酸素が付加した中間体が生成して、一部はC(2)と

C(3)が開裂してTHL、OXAなどが生成し、他方この酸素付加物から O_2^- が放出されMDASAが生成するというものである。MDASAからは不均化反応によりDASAとASAが生成する。ASAの酸化の過程において三重項酸素がASAに一定距離以内に接近すると一重項酸素と類似した性質を帯びてくる可能性が示唆された。このように三重項酸素によるASAの酸化は確かに起こり、その反応機構としてASAのC(2)に酸素が付加した中間体を経て反応すること、さらにDASAを生成し O_2^- の生成を伴う経路に比較して量的には少ないものの、DASAを経由せずにC(2)-C(3)の開裂が起こる新たな反応経路が存在することが初めて明らかにされた。



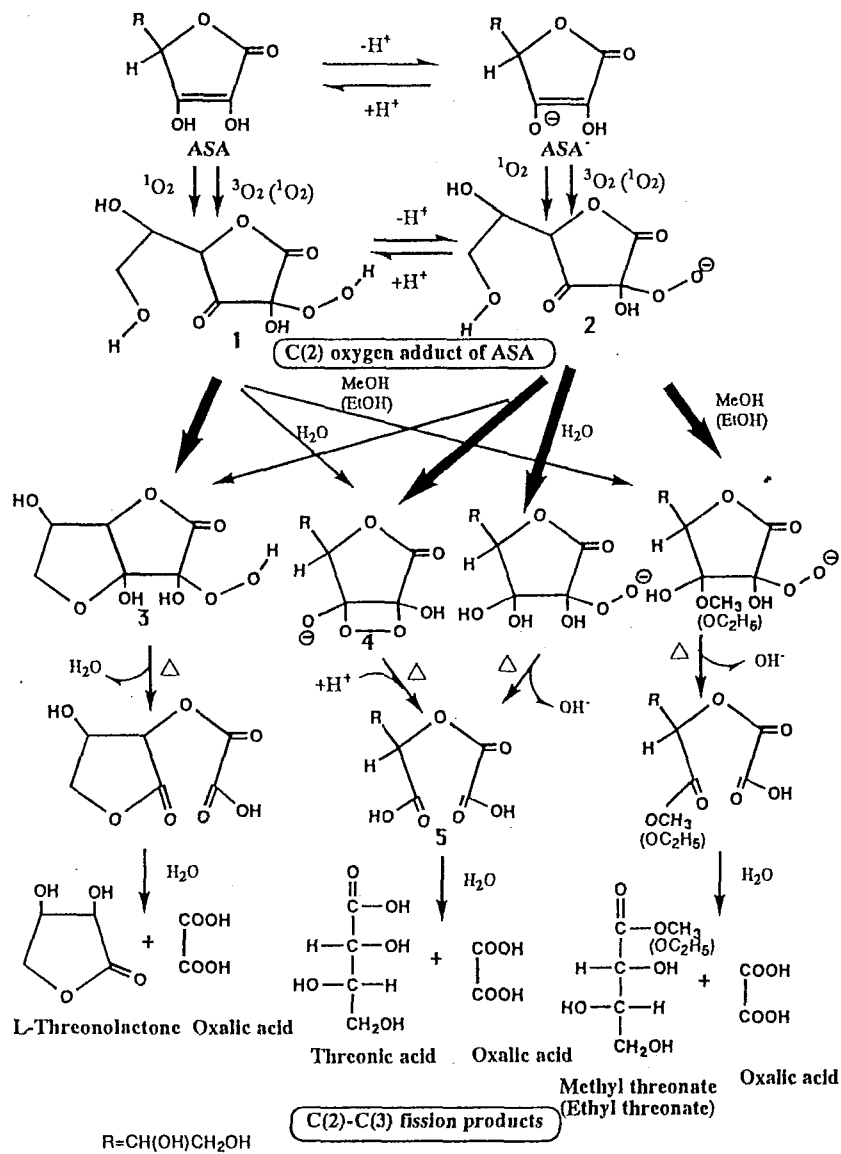
Scheme 4-3 Possible reaction mechanism of autoxidation of ASA

第III章の3.3.2.4で述べられたASAの非解離型と解離型で酸化生成物のパターンに違いが生じた理由について考察する。すなわち、ASAの非解離型では、THLとOXAが主要な酸化生成物であったのに対し、ASAの解離型では、OXA以外のC4の生成物としてTHLよりも、スレオン酸のメチルエステル（またはエチルエステル）及びスレオン酸の生成量が高かった。これら生成物の大きな違いはTHLはラクトン環をもつが、スレオン酸のメチルエステル（またはエチルエステル）及びスレオン酸は鎖状の構造を有していることである。この両者の違いは、ASAの酸素付加物から先の反応がこの酸素付加物が解離しているか否かで異なってくるためと考えられた。Scheme4-4にScheme4-1で示した4個のASAのC(2)酸素付加物の可能な存在形態のそれぞれのHOMOとLUMOを示す。ペルオキシアニオン型(I)、オ



Scheme 4-4 HOMO and LUMO of possible structures of C(2) oxygen adduct of ASA

キシドペルオキシジアニオン型(Ⅲ)についてはLUMOはいずれもASAのC(3)に局在し、HOMOはそれぞれ解離している酸素原子に存在している。これに対し、非解離型(Ⅱ)のHOMOはC(1)とC(3)のカルボニル基の酸素原子に、LUMOはC(3)のカルボニル基に存在していた。また、オキシドアニオン型(Ⅳ)においてはHOMOはC(2)の水酸基の解離した酸素原子に、LUMOはC(3)のカルボニル基に局在していた。従って、ペルオキシアニオン型(Ⅰ)、オキシドペルオキシジアニオン型(Ⅲ)については、C(2)のペルオキシ基のHOMOがASAのC(3)のLUMOと反応して、ジオキセタン化合物を生成する可能性が高いと推定された。しかしながら、非解離型(Ⅱ)やオキシドアニオン型(Ⅳ)についてはそのような可能性は低いものと考えられる。このようなASAのC(2)酸素付加物の解離状態の違いによるジオキセタン構造の生成のしやすさをふまえて、ASAの非解離型と解離型での酸化生成物のそれぞれの生成機構を示したのがScheme4-5である。ASAの酸素付加物が非解離型(1)の場合はASAの側鎖のC(6)の水酸基がC(3)のカルボニル基と反応してヘミケタールを形成し、bicyclicな構造(3)をとりやすいが、ASAの酸素付加物が解離型(2)の場合はヘミケタールを形成しにくいのではないかと推定された。従って、非解離型(1)の場合には鎖状のスレオン酸及びそのエステルは生成しにくく、酸素付加物のC(2)-C(3)の開裂の結果、ほとんどがTHLとOXAになるものと考えられた。これに対し、解離型(2)では、bicyclicな構造をとっていないASAの酸素付加物(2)がジオキセタン化合物(4)あるいはC(3)の水和を経てC(2)-C(3)の開裂のみが起きた中間体であるdicarboxyl化合物(5)が生成されるものと考えられた。このジオキセタン構造を有する化合物(4)は前述したように非解離型(1)ではそのHOMO及びLUMOから考えて生成しにくい、解離型(2)、すなわちペルオキシアニオン型(Ⅰ)(Scheme4-4参照)では、C(2)のペルオキシ基のHOMOがASAのC(3)の



Scheme 4-5 Possible oxidation pathway of ASA (non-dissociated form) and ASA (anion) in solution

LUMOと反応して生成する可能性が高く、MOPACのPM3法での計算結果からも支持される反応経路である。このジオキセタン構造を有する化合物(4)からさらに炭素2個から成る化合物(C2化合物)すなわちOXAと、炭素数4の化合物(C4化合物)に分解した際のC4化合物がスレオン酸である。スレオン酸のメチルエステル(またはエチルエステル)も同様にbicyclicな構造をとっていないASAの酸素付加物(2)のC(3)が溶媒和後、C(2)-C(3)の開裂が起こり分解したものと考えられた。さらに、第Ⅲ章で述べたようにこのC(2)-C(3)開裂生成物の収率はASAの解離型では非解離型の場合に比較して高いことが認められた。

しかし、いずれの場合もASAのC(2)酸素付加物を經由してC(2)-C(3)の開裂が起こり、C2化合物とC4化合物に分解していくという点では共通しており、Scheme4-3で示した推定反応機構はASAの溶液中での存在形態に関わらず、さらには溶媒の種類などにも関わらず、適用できるものと推察された。

第V章 アスコルビン酸関連化合物の自動酸化反応機構について

5.1 目的

第IV章までにASAの自動酸化反応機構として、ASAのC(2)酸素付加物を經由する新たな反応経路を提示した。この反応機構では、ASAのC(2)酸素付加物から一部はC(2)-C(3)炭素結合の開裂によりTHLやOXA等が生成し、また他方このC(2)酸素付加物から O_2^- の脱離と共に、MDASAが生成するというものである。本章では、この反応機構がASAのみならず、ASA関連化合物の自動酸化反応においても成り立ち得るか否かについて明らかにすることとした。

ASA関連化合物としては、まずASAの5位の炭素の立体配置が異なるエピマーであるD-イソアスコルビン酸(D-アラボアスコルビン酸)、すなわちエリソルビン酸(ERA)を選び(Fig. 5-1参照)、ASAの側鎖の立体配置の違いが自動酸化反応経路にどのような影響を及ぼすかについて検討を行うこととした。次に、ASAの化学的な性質のうちでASAの自動酸化反応に最も関連の深いのはその電子供与性であるが、この電子供与性に最も関与する部分構造であるエンジオール基 ($-C(OH)=C(OH)-$) に着目することとした。ASAはエンジオール基にさらにカルボニル基が1個ついた $-CO-C(OH)=C(OH)-$ という共役系を有しており、この部分構造を保持する物質は酸性溶液中でも還元性を示すため、aci-reductoneと呼ばれている[17]。本章では、最も単純なaci-reductoneである2,3-dihydroxy-2-propenal、すなわちトリオースレダクトン(TR)をASA関連化合物のひとつとして取り上げることにした。(Fig. 5-1参照)

このERAとTRにつき、ASAの場合と同様に自動酸化反応を行い、その分解率を測定し、その酸化生成物について、GC、GC-MS、HPLCなどの分析化学的手法を用いて分離・同定を試みることにした。次に、ASAの場合と同様にその酸化反応過程において O_2 が生成しているかどうかについて

も調べることにした。さらに、その反応機構について詳しい情報を得るために、計算化学的手法(MOPACのPM3法)を用いて酸素分子との反応について検討を行い、ASAの場合と同様に一重項酸素の自動酸化反応への関与の可能性や、酸素付加物の生成の可能性について調べることにした。また、ASAの酸化反応の進行に及ぼすASAの部分構造の影響について調べるために、ERA、TRについてASAの場合と比較して計算化学的手法(MOPACのPM3法)と電気化学的手法のひとつであるサイクリックボルタンメトリー(CV)を用いて検討を行った。

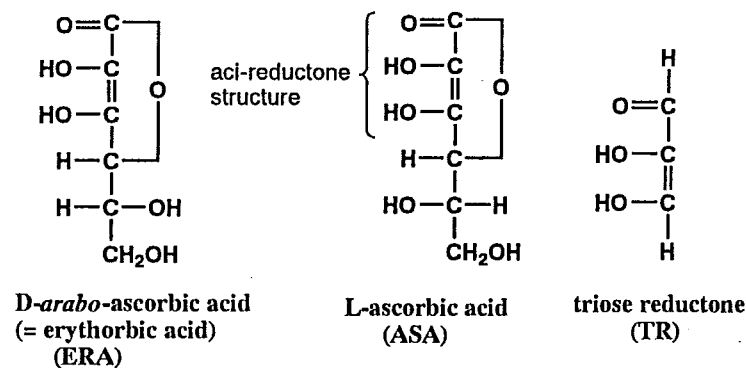


Fig. 5-1 Structure of ERA and TR

5.2 実験材料と方法

5.2.1 エリソルビン酸、トリオースレダクトンの自動酸化反応

ERAは和光純薬(株)製の、エリソルビン酸のNa塩(ERA-Na)は東京化成工業(株)製の特級試薬を再結晶して用いた。TRはvon Eulerらの方法[155]に従って次のようにグルコースから合成したものをを用いた。その他の試薬は市販の特級試薬をそのまま用いた。

Synthesis Procedure of Triose Reductone (TR)

Glucose (230g)

- Dissolved in distilled water (2000ml) and heated at 87~89°C
- Added lead acetate (126g) dissolved in hot water(150ml)
- Added 17.2M NaOH solution (110ml) with cooling
- Added acetic acid (70ml) with cooling
- Centrifuged and filtered with a glass filter (No.4)

Precipitate (lead salt of Triose reductone)

- Washed with water and acetone
- Sucked dry for 2 hours
- Suspended in acetone(500ml) and added activated charcoal
- Added conc. H₂SO₄ (16ml) gradually with cooling
- Stirred for 1 hour
- Filtered with a glass filter (No.4)

Filtrate

- Concentrated

Crude crystals

- Added hot acetone and recrystallized

Colorless crystals (Triose reductone)

5.2.1.1 メタノール中、酸素通気下でのエリソルビン酸、トリオースレダクトンの自動酸化反応

酸素を通気した場合のメタノール中でのERA、TRの自動酸化反応は第II章の2.2.1のASAの自動酸化反応で述べた方法に従って行った。

5.2.1.2 種々の溶液中、酸素非通気下でのトリオースレダクトンの自動酸化反応

TRを15 μ Mの濃度で純水、希塩酸溶液(pH2)、メタノール、アセトニトリルにそれぞれ溶解し、25 $^{\circ}$ C、30 $^{\circ}$ C、40 $^{\circ}$ Cで酸素ガスを通気せずに酸化反応を行った。

5.2.2 エリソルビン酸、トリオースレダクトンの残存率の測定

5.2.2.1 メタノール溶液中でのエリソルビン酸残存率の定量

第II章の2.2.2.2のメタノール及びエタノール溶液中でのASA残存率の測定に用いたHPLC法によりERAの定量を行った。なお、ERAのRTは3.3分であった。

5.2.2.2 種々の溶液中でのトリオースレダクトンの残存率の定量

上記酸化条件下でのTRの濃度は50 μ Mあるいは15 μ Mであり、メタノール溶液中での紫外部吸収極大は275nmとASAの場合に比較してかなり長波長側であった。この275nmにおける吸光度は第II章で述べたような、アルコール中への酸素ガス通気により生じる205nm近辺の吸収ピークの影響を受けないことが認められた。そこで純水、希塩酸溶液(pH2)、メタノール、アセトニトリルの各溶媒中におけるTRの残存率を第II章の2.2.2.1で述べたUV法により、各溶液中の吸収極大波長における吸光度を測定して求めた。なお、純水、希塩酸溶液(pH2)、メタノール、アセトニトリル中でのTRの吸収極大はそれぞれ、290nm、265nm、275nm、263nmであった。

5.2.2.3 エリソルビン酸及びトリオースレダクトンの残存率の算出方法

ERA及びTRの残存率の算出方法は第II章の2.2.2.3のASA残存率の算出方法に従って行った。

5.2.3 サイクリックボルタンメトリー

ASA、ERA、TRをそれぞれ3mMの濃度で0.1Mリン酸緩衝液(NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 , pH7)、0.1Mリン酸緩衝液(pH2)、0.1M過塩素酸ナトリウム水溶液、0.1M過塩素酸ナトリウムメタノール溶液に各々溶解して試料とした。BAS100Bエレクトロケミカルアナライザーを用いて測定を行った。電気化学セルはVC-3ボルタンメトリー用セルを用い、作用電極としてはグラッシーカーボン電極(3mm i. d.)を、カウンター電極としてはプラチナワイヤー電極(5cm)を、参照電極としては水溶液中では銀/塩化銀(飽和NaCl溶液)水系参照電極を、溶媒中では銀/銀イオン(0.1M過塩素酸テトラブチルアンモニウム-アセトニトリル溶液)非水溶媒系参照電極をそれぞれ用いた。CVの走査(スイープ)速度は250mVで行った。グラッシーカーボン電極は測定前にBAS PK-2セル研磨キットのアルミナ用研磨パットで研磨用アルミナを用いて研磨した。また、試料溶液は測定前に10分間窒素ガスを通気した。

5.2.4 エリソルビン酸、トリオースレダクトンの酸化生成物の分離・同定

5.2.4.1 エリソルビン酸の酸化生成物の分離・同定

ERA酸化生成物の分離・同定は第三章3.2.2のASA酸化生成物の分離・同定の方法に従ってTMS誘導体にし、GC及びGC-MSにより行った。

5.2.4.2 トリオースレダクトンの酸化生成物の分離・同定

TRのメタノール中での酸化反応液(200ml)を30℃以下で減圧下50倍に

濃縮し、以下の条件でHPLCにより分析を行った。

Chromatographic Condition

(condition of separation)

Column ; Shim-pack SCR-102H (300 x 8 mm i.d.) × 2
Guard column ; guard column for SCR-102H (50 x 6 mm i.d.)
Eluent ; 2mM *p*-toluenesulfonic acid
Apparatus ; Shimadzu LC-10AD
Flow rate ; 0.8ml/min

(detection)

Reaction mixture ; 2mM *p*-toluenesulfonic acid
8mM Bis-Tris
0.1mM EDTA
Flow rate ; 0.8ml/min
Detector ; Conductometric detector
(Shimadzu CDD-6A)

さらに、第Ⅲ章3.2.2のASA酸化生成物の分離・同定の方法に従ってMSTFAを用いて酸化生成物をTMS誘導体にし、GC及びGC-MSによる分析も行った。

5.2.5 エリソルビン酸酸化生成物の定量

エリスロノラクトン(ERL)の定量は第Ⅲ章3.2.5.1のTHLの定量法と同様に行った。なお、ERLのRTは8.6分であった。OXAの定量は第Ⅲ章3.2.5.2のOXAの定量法と同様に行った。DERAの定量は第Ⅲ章3.2.5.3のDASAの定量法と同様に行った。

5.2.6 エリソルビン酸、トリオースレダクトンのメタノール中での酸化反応における O_2^- の検出実験

ERA、TRのメタノール中での酸化反応における O_2^- の生成について、第Ⅳ章4.2.2.2のメタノール溶液中での O_2^- の検出実験の方法に従ってNBTを用いて調べた。

5.2.7 分子軌道法の計算方法

第Ⅱ章2.1.3の計算方法と同様に行った。

5.2.8 検定法

各値の有意差の検定はStudentの t-検定により行い、危険率5%以下を有意と判定した。

5.3 結果及び考察

5.3.1 エリソルビン酸の自動酸化反応

5.3.1.1 エリソルビン酸の酸化分解率

ERAのメタノール中での自動酸化反応を行った場合のERA残存率をASAの場合と比較して、Fig. 5-2に示す。ERAの残存率は反応時間30分で77.8%、60分で45.9%となり、ASAの場合のそれぞれ74.7%、50.2%と比較してほぼ同程度の残存率を示した。水溶液中では一般的にERAはASAと比較して不安定であると報告されており[29]、これは第一解離定数の違いがその理由のひとつであると考えられている。すなわち、ASAの第一解離定数は18℃において 8.30×10^{-5} であるのに対し、ERAの場合は 1.10×10^{-4} と、ERAの方がやや大きい第一解離定数を有すると報告されている[156]。

ASAとERAの酸化反応についてさらに情報を得るために、電気化学的分析方法のひとつであるサイクリックボルタンメトリー(CV)による分析とMOPACのPM3法による計算を試みた。Fig. 5-3にASAとERAのサイクリックボルタモグラムの一例を示す。これはpH7のリン酸緩衝液中での測定結果で、酸化反応すなわちアノードのピークのみが観測され、ASAは電極での電気化学的な反応においては非可逆的であることが認められた。これは、すでに報告されている水溶液中でのASAの電気化学的な挙動に関する結果[157-160]とも一致するものである。このように非可逆的な挙動を示す理由としては、ASAから2電子酸化されて生成したDASAのC(2)及びC(3)のカルボニル基が非常に水和されやすく[101]、この水和反応速度が非常に速やかであるのに対し、安定な水和型から電気化学的に活性な非水和型への移行は比較的遅いため、逆反応は起こらないものと考えられている[161, 162]。ERAについてもASAと同様の結果が認められ、これはIheanachoら[163]の報告とも一致した。このようなASA及びERAの電気化学

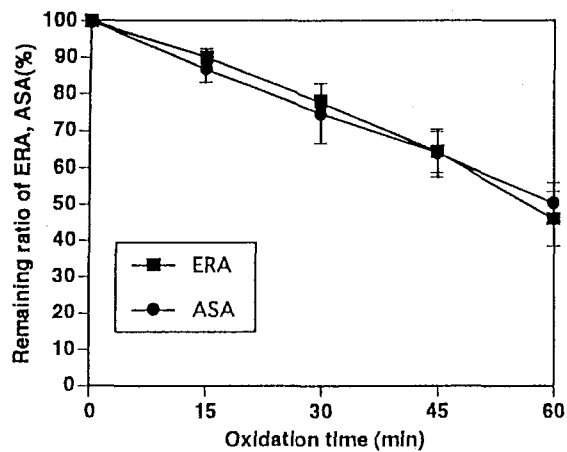


Fig. 5-2 Degradation ratio of ERA and ASA in MeOH

Data represent means \pm SD (n=5) and expressed as a ratio, with the initial amounts of ERA or ASA regarded as 100%.

ERA or ASA concentration : $50 \mu\text{M}$

Reaction solution : MeOH

Reaction temperature : 25°C

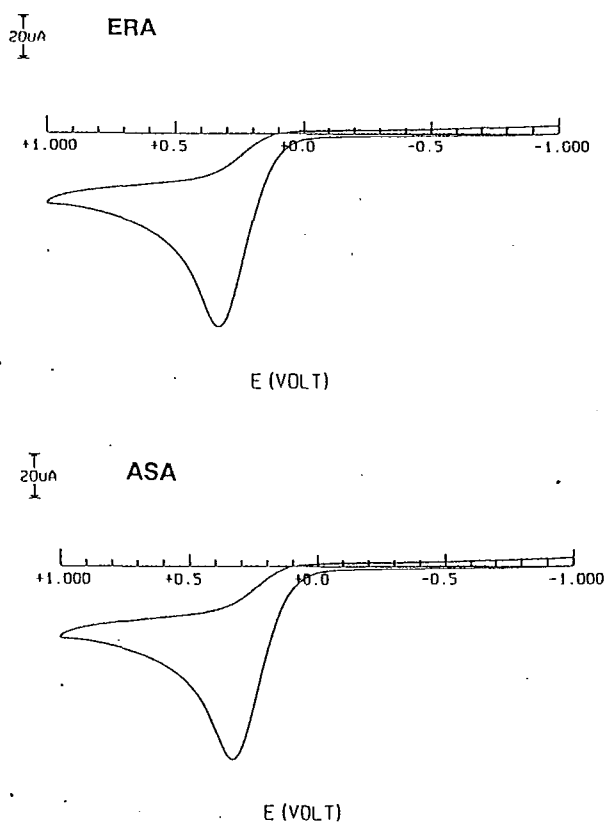


Fig. 5-3 Cyclic voltammograms of ERA and ASA in aqueous solution

[Condition of CV]

Working electrode; glassy carbon

Reference electrode ; Ag/AgCl (saturated NaCl)

Supporting electrolyte; 0.1M phosphate buffer (pH7)

Scan rate; 250mV/sec

的に非可逆的な挙動はpHを変化させた場合や、メタノール、エタノール、アセトニトリル(0.1%水含有)などの有機溶媒系においても観測された。これまで、有機溶媒系でのASAの電気化学的な分析については研究されてきておらず、メタノールなどにおいても水溶液中と同様の電気化学的な挙動を示したことは興味深い。Table5-1にASA及びERAの各溶液中で測定したCVのアノードのピーク電位とMOPACのPM3法で計算したASA、ERAそれぞれの解離型及び非解離型のHOMOのエネルギーレベルを示した。まず、ASAの水溶液中でのアノードのピーク電位はpH7、pH3.3、pH2で銀・塩化銀の水系参照電極を基準として、それぞれ297.3mV、470.3mV、509.4mVとなった。この時のASA濃度での紫外外部吸収の吸収極大はpH7、pH3.3、pH2でそれぞれ265nm、246nm、245nmとなり、ほとんど解離型であると考えられるpH7の方が非解離型が多く存在すると考えられるpH2に比較して低い値を示し、pH7の場合(すなわち解離型)の方が酸化されやすいという結果とも矛盾しなかった。この時のHOMOのエネルギーレベルもすでに第II章でも述べたように解離型の方が高く、電子を与えやすい、すなわち酸化されやすい性質を示唆しており、このCVでの結果とも一致した。ERAの水溶液中でのCVの結果もASAの場合と同様に、pHが高いほどアノードのピーク電位が低くなり、酸化されやすいことが示唆され、HOMO

Table 5-1 Anodic peak potential by cyclic voltammerty and energy levels of HOMO by MOPAC of ASA and ERA

	Anodic peak potential			Energy level of HOMO	
	ASA	ERA		ASA	ERA
	(mV vs. Ag/AgCl)*			(eV)	
0.1M phosphate buffer (pH7)	297.3 ± 8.5	375.2 ± 12.8	dissociated	-3.82	-4.06
0.1M NaClO ₄ (pH3.3)	470.3 ± 15.5	490.8 ± 14.0			
0.1M phosphate buffer (pH2)	509.4 ± 45.7	623.7 ± 9.7	non-dissociated	-9.57	-9.61
	(mV vs. Ag/Ag ⁺)*				
0.1M NaClO ₄ in MeOH	610.1 ± 9.3	648.3 ± 13.4			

Means ± SD (n=6)

* Reference electrode
aqueous solution ; Ag/AgCl (saturated NaCl)
non-aqueous solution ; Ag/Ag⁺(TBAP/acetonitrile)

のエネルギーレベルも解離型が -4.06eV であるのに対し、非解離型が -9.61eV となり、MOPACのPM3法の計算結果とも一致する結果となった。次に、ASAとERAとの比較であるが、CVのアノードのピーク電位についてはいずれのpHにおいてもERAの方がASAよりもやや高い傾向を示し、ASAの方がERAよりも酸化されやすい傾向にあることが示唆された。また、HOMOのエネルギーレベルも解離型、非解離型ともに大きな差ではないもののASAの方がERAよりもやや高い傾向を示し、CVでの分析結果とも一致する結果となった。さらにメタノール中で測定したCVのアノードのピーク電位は、銀・銀イオンの非水系の参照電極を基準として、ASA、ERAでそれぞれ 610.1mV 、 648.3mV となり、ほとんど差は認められないが、ASAの方がやや低い結果となった。この 3mM という濃度ではASAおよびERAのメタノール溶液の紫外部の吸収極大はどちらも 245nm であったことから、この濃度のメタノール溶液ではASAもERAも非解離型をとっていると考えるのが妥当であり、HOMOの計算結果とも矛盾しない結果である。従って、CV分析及びMOPAC (PM3法)の計算結果からはASAの方がERAよりも若干、電子供与性が大きく、より酸化に対して不安定であることが推察された。

しかし、ASAとERAの酸化のしやすさはpHや共存する化合物などによっても影響を受けることが指摘されており[29, 164]、反応条件により、この2つの化合物の安定性には違いが生じるものと推測された。当研究室では本実験条件よりも低濃度($1.7\mu\text{M}$)のERA及びASAメタノール溶液を用いて酸素を通気せずに酸化反応を行った場合、ERAよりもASAの方が残存率が高かったという結果を得ている[165]。同じメタノール溶液中での反応であるが、自動酸化反応におけるASAとERAとの残存率の差が小さくなったのには、ASA及びERAの初濃度と溶液中の酸素濃度が関与しているものと考えられる。この実験条件のASA及びERAの初濃度、 $50\mu\text{M}$ では、第II章で述べたようにその紫外部吸収スペクトルより判断して、そのほ

とんどが非解離型をとっていると考えられるのに対し、 $1.7\mu\text{M}$ という非常に希薄な溶液中ではその吸収極大は長波長側にシフトして約 270nm になったことから、ASA及びERAの溶液中での存在形態が変化し、解離型の割合が高くなったものと推測された。このような存在形態の違いや、酸素ガスの通気の有無による反応溶液中の酸素濃度の差異なども今回得られたこれらの実験結果に寄与しているものと推察された。また、さらに自動酸化反応は酸素分子との反応であるのに対し、CV法は電極界面での電子の授受反応であるので化合物の酸化反応を理解する上でのひとつの手がかりにはなるが、全く同一の反応とは考え難い。このことも今回の自動酸化速度の実測結果とCV測定の結果との違いの一因となっているのかもしれない。

5.3.1.2 エリソルビン酸の酸化反応生成物

ERAをメタノール中で60分間酸化反応を行い、TMSI-Hを用いてTMS誘導体にしてGC分析した結果と、ERA-Naをメタノール(0.1%水含有)中で30分間酸化反応を行い、同じくTMS誘導体にしてGC分析した結果をFig. 5-4に示す。

まず、ERAについては、RT 22.7分のピークはGC-MS分析の結果より分子イオンピークが m/z 464に現れ、ASAのTMS誘導体のマススペクトル[135, 136]と一致したことから未反応のERAであると考えられた。酸化生成物については、最も生成の可能性が高いものは酸化型ERA (DERA)であるが、第三章で示したDASAのTMS誘導体のピークのうちDASAのカルボニル基の1個がメタノールで溶媒和したもの(DASA(MeOH)+3TMS)とマススペクトルが一致したのがRT 16.6分のピークである。従ってこのピークはDASAの場合と同様にDERA(MeOH)+3TMSであると推定された。その他のDERAに関すると思われるピークの中にはASAの他のピークとRTの近いもの

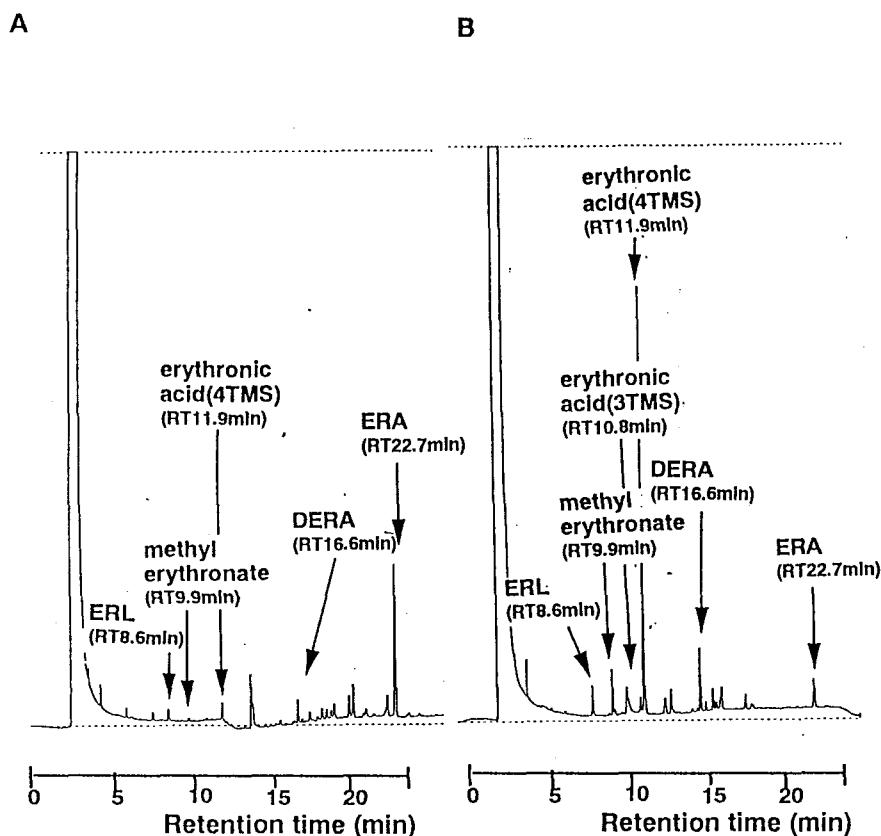


Fig. 5-4 Gas chromatogram of TMS derivatives of ERA oxidation products and ERA-Na oxidation products in MeOH

TMS reagent; TMSI-H

A: ERA oxidation products in MeOH
Reaction time; 60min

B: ERA-Na oxidation products in MeOH
Reaction time; 30min

もあったが、マススペクトルが異なり、同定には至らなかった。RT 8.6分のピークは標品のD-エリスロノ-γ-ラクトンとRTが一致し、GC-MS分析において、分子イオンピークが m/z 262に現れ、そのマススペクトルが文献記載[138]のものと一致したことから、エリスロノ-γ-ラクトン(ERL)のTMS誘導体であると同定した。なお、ERLはTHLの立体異性体であり、そのマススペクトルはTHLの場合と一致した。次に、RT 9.9分のピークは、GC-MS分析の結果、 m/z 351は M^+-15 であると考えられ、第三章で示したスレオン酸メチルエステルのTMS誘導体のものと一致し、

出発物質がERAであることを考慮に入れるとエリスロン酸メチルエステルのTMS誘導体であると推定された。RT 10.8分のピークはGC-MS分析の結果、 m/z 337は M^+-15 であると考えられ、分子量352のエリスロン酸(3TMS)であると推定された。なお、このマススペクトルはスレオン酸(3TMS)とも一致した。また、RT 11.9分のピークは、GC-MS分析の結果、 m/z 409は M^+-15 であると考えられ、そのマススペクトルも分子量424のASAの場合のピークC、すなわちスレオン酸(4TMS)と一致したことから、エリスロン酸(4TMS)であると推定された。

ERA-Naについても、ERAの場合と同様に、DERA、ERL、エリスロン酸、エリスロン酸のメチルエステルの生成が確認された。また、ガスクロマトグラム上の各ピークの高さを見てみると、エリスロン酸、エリスロン酸のメチルエステルの生成量がERAの場合と比較して大きく、ASA、ASA-Naの場合との類似性が認められた。

次に、ASAの場合と同様に、ERL等以外のもうひとつのC(2)-C(3)開裂生成物であると推定されるOXAのERAの酸化反応における生成の可能性について調べるために、さらに強力なTMS試薬であるMSTFAを用いて反応時間90分の試料をTMS誘導体にし、GC分析を行った結果をFig. 5-5に示す。その結果、RT 16.7分のピークがOXAの標品とRTが一致し、マススペクトルについても標品及び文献記載のもの[135, 136]と一致したので、OXAのTMS誘導体であると同定された。なお、このRTが第III章で示したOXAのRTよりもやや小さいのは本章では第III章の場合よりもやや短い25mのカラムを用いたからである。

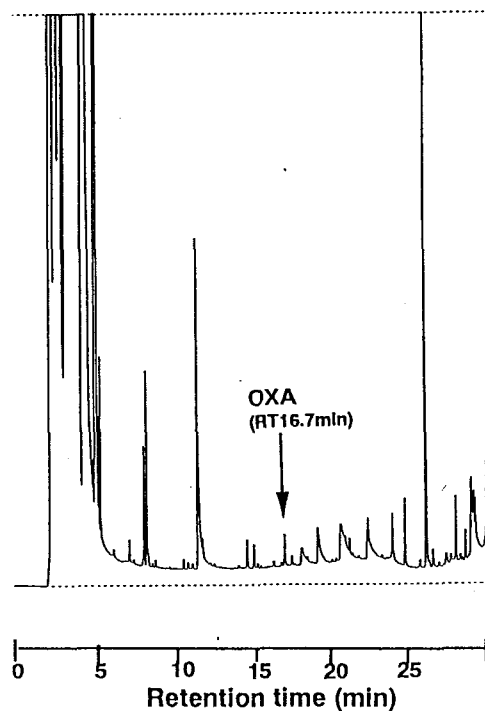


Fig. 5-5 Gas chromatogram of TMS derivatives of ERA oxidation products in MeOH

Reaction time ; 90min
TMS reagent ; MSTFA

このようにERAのメタノール中における酸化反応においてもDERAの他、ERL、エリスロン酸、エリスロン酸のメチルエステル、OXAといったASAの場合と同様の反応生成物が認められ、ERAの場合にもERAのC(2)の酸素付加物を經由してC(2)-C(3)の開裂が進行するという酸化反応経路の存在が示唆された。

5.3.1.3 エリソルビン酸の酸化反応における化学量論

ERAのメタノール中における酸化反応について、ERA残存率の測定と、主要生成物であると考えられるDERAとC(2)-C(3)開裂生成物のうちERLとOXAの定量を行い、ASAの場合と比較して示したのがTable5-2である。前

述したようにERA及びASAの残存率はほぼ同程度であり、DERAの収率も反応時間30分で20.2%、60分で48.1%とDASAの収率とほぼ同程度であった。このDERAの収率は消失したERAの大部分を説明できる量であり、ERAの場合も主要な酸化生成物はDERAであることが確認された。しかしながら、C(2)-C(3)開裂生成物の収率については、ERAはASAの場合とやや異なる結果となった。まず、ERLの収率が反応時間30分では0.8%、60分では1.0%とASAの場合のTHLの収率に比べると低い値を示し、反応時間60分ではERLの方がTHLに比較して5%の危険率で有意に低かった。次にOXAの収率について見てみると、ERAの酸化反応においては、反応時間30分において0.7%とASAの場合に比較するとやや低いものの、ERLの収率(0.8%)とほぼ等モルであった。しかしながら、反応時間60分においてはERAの場合のOXA収率は3.8%とASAの場合とほぼ同程度を示した。ちなみに、反応初期においてはERAのC(2)-C(3)開裂生成物はERLとOXAがほとんどであるが、反応時間が長くなってくるとERL以外の生成物の割合が高くなっていくものと仮定して、5.3.1.2のERAの酸化生成物の分離・同定の結果で示したガスクロマトグラム上の各ピークの高さを見てみると、ERAの場合、ERLのピークに比較してエリスロン酸やエリスロン酸のメチルエステルのピークが大きかったことが特徴的であった。これらの化合物は第四章で述べたASAの酸化反応におけるスレオン酸等の生成機構と同様に、C(2)酸素付加物を生成した後、bicyclicな構造にならずにC(2)-C(3)の開裂が起きて生成したものと推察される。従ってERAではERLの収率が低いのはC(2)-C(3)開裂生成物が生成しにくいのではなく、ERAの5位の水酸基の立体配置がASAと異なるため、ASAの場合のようなC(2)酸素付加物のbicyclicな構造をとりにくいためと考えられた。ERAの酸化反応におけるC(2)-C(3)開裂生成物の収率については、OXAの収率から判断してASAの場合とほぼ同程度であると考えられた。

Table 5-2 Remaining ratio of ERA and yield of DERA, ERL and OXA

	30min		60min	
	ERA	ASA	ERA	ASA
Remaining ratio of ERA, ASA (%)	77.8 ± 2.1	74.7 ± 8.1	45.9 ± 7.5	50.2 ± 5.5
Yield of DERA, DASA (%)	20.2 ± 6.6	21.0 ± 2.7	48.1 ± 2.3	42.5 ± 5.6
Yield of ERL, THL(%)	0.8 ± 0.1	1.8 ± 0.9	1.0 ± 0.1*	4.7 ± 1.7
Yield of OXA (%)	0.7 ± 0.1	1.8 ± 0.7	3.8 ± 0.4	3.1 ± 0.8

*; p<0.05, significantly different from ASA in MeOH

Data represent means ± SD (n=4) and are expressed as a ratio, with the initial amounts of ERA or ASA regarded as 100%.

ERA, ASA concentration ; 50 μM

Reaction solution ; MeOH

Reaction temperature ; 25°C

5.3.1.4 エリソルビン酸の酸化反応における O_2^- の生成

ERAのメタノール中での酸化反応における O_2^- の生成の可能性についてNBTを用いて調べた結果がFig. 5-6である。ERAの場合も反応時間30分及び60分で、560nmでの吸光度は0.04から0.05に上昇し、ホルマザンの生成が認められた。従ってERAのメタノール中での酸化反応においても、 O_2^- の生成が確認された。ERAの酸化反応における O_2^- の生成量がASAの場合と同程度であったことは、前述したDERAの収率がDASAの収率とほぼ同じくらいであった結果と考え合わせると、ASAの自動酸化反応機構と同様の反応がERAの場合も起きていることを支持するデータであるといえよう。すなわち、その酸化反応過程において、C(2)酸素付加物を経て O_2^- の脱離を伴い、モノデヒドロERAが生成し、さらに不均化反応により、デヒドロ（酸化型）ERAが生成すると考えられた。

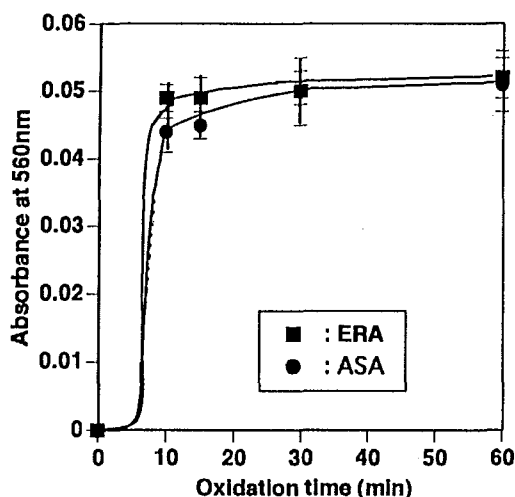
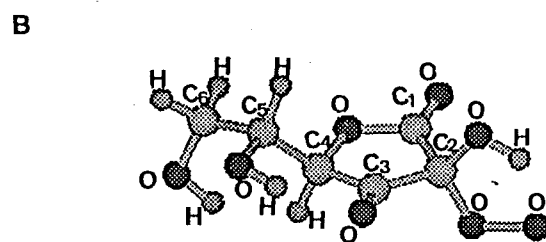
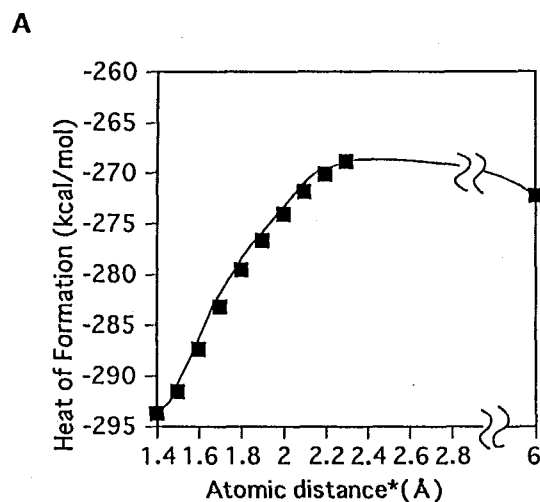


Fig. 5-6 Reduction of NBT In the autoxidation of ERA and ASA in MeOH

Values are means \pm SD (n=6).
 ERA, ASA concentration ; 50 μ M
 NBT concentration ; 61 μ M
 Reaction solution ; MeOH
 Reaction temperature ; 25°C

5. 3. 1. 5 エリソルビン酸の酸化反応についての分子軌道法による検討

ERAの自動酸化反応機構につき、さらに詳しく調べるために計算化学的手法による検討を行った。ERAと酸素分子の相互作用についてASAの場合と同様にMOPACのPM3法を用いて半経験的分子軌道法の計算を行った。ERAのモノアニオンの2位の炭素分子(C(2))に酸素分子を接近させていった場合のERAの解離型と酸素との系でsuper-moleculeとして扱って計算を行った。Fig. 5-7は上図がERAのアニオンに一重項酸素を接近させた場合、すなわちRHFで計算したときのsuper-moleculeの生成熱の変化を表したもので、下図がERAのC(2)酸素付加物(アニオン)の平衡構造を示す。ERAのC(2)と酸素分子との距離が2Å程度に小さくなってくると生成熱は徐々に低くなり、1.5Åでは約-290kcal/molを示した。この値はERAと一重項酸素分子が十分離れているとき、すなわち両者間の距離が6Åの場合、-272.3kcal/molであったのと比較すると約20kcal/molも生成熱が低くなることが認められ、両者の接近に伴い反応が進みやすくなる傾向にあることがASAの場合と同様に示唆された。このようにERAの場合においてもERA



Heat of formation ; -293.7kcal/mol

Fig.5-7 Heat of formation of the super-molecule of ERA (anion) with oxygen and optimized structure of C(2) oxygen adduct of ERA (anion)

A ; Heat of formation of the super-molecule of ERA (anion) with oxygen

B; **Optimized structure of C(2) oxygen adduct of ERA (anion)

*Distance between the C(2) of ERA monoanion and the reacting oxygen atom of oxygen molecule, calculated by RHF-singlet

**Optimized structure was visualized by MOLGRAPH developed by DAIKIN Industries Ltd.

に酸素分子が接近するとsuper-molecule中の酸素は一重項状態で存在することが比較的容易になるものと推定された。十分接近した場合、最終的にはERA (アニオン) のC(2)に酸素分子は結合するようになり、ERAのC(2)酸素付加物の生成の可能性が示された。このERAのC(2)酸素付加物の生成熱は-293.7kcal/molで、C(2)と付加した酸素分子との距離は

1.40 Åであった。Fig. 5-8はERA (アニオン) のC(2)に酸素分子を接近させた時のERAのC(2)と酸素分子の正味の電荷の変化を示したものである。ASAの場合と同様にERAのC(2)と酸素分子との距離が小さくなるにつれて酸素分子の負電荷が大きくなるのに対し、ERAのC(2)の負電荷が小さくなる傾向が認められ、徐々にERAのC(2)の電子が酸素分子側に移動していくことが示唆された。このようにERAのC(2)と酸素分子との接近に伴い、両者間に相互作用が生じてERAと酸素分子が結合するようになるものと考えられた。ERAのC(2)酸素付加物 (アニオン) では、C(2)の正味の電荷は0.262となったのに対し、付加した酸素分子の電荷は合計して-0.816と負電荷が大きかった。このようにERAのアニオンに酸素分子が接近すると、酸素分子が一重項酸素的な挙動を示すようになり、ERAのC(2)酸素付加物が生成するようになることが示唆され、ERAの場合にもASAの場合と同様な自動酸化反応機構が考えられることが計算化学的にも支持された。

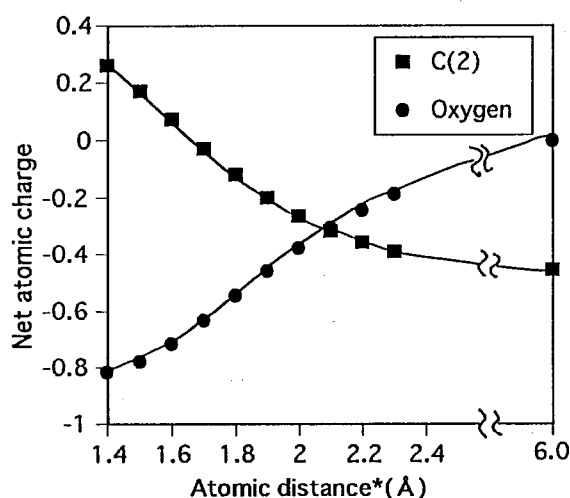


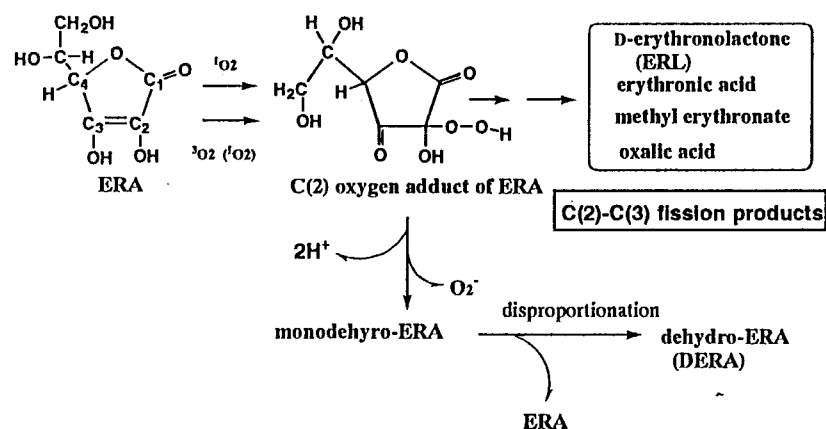
Fig. 5-8 Net atomic charges in various distance between the C(2) of ERA (anion) and oxygen molecule

*Distance between the C(2) of ERA monoanion and the reacting oxygen atom of oxygen molecule.
Data represent the net atomic charges of C(2) of ERA and the oxygen molecule.

さらに、このERAのC(2)酸素付加物ではC(3)のカルボニル基の酸素原子とC(5)の水酸基の水素原子との原子間距離は1.86 Åであり、水素結合が生じている可能性が考えられる。これはC(5)の水酸基の立体構造が異なるASAでは見られなかったことで、この水素結合がこの酸素付加物の側鎖がヘミケタールを形成していない開環構造を安定化している可能性が推察された。すなわち、前述したようにERAの自動酸化反応においてERLの収率が低く、この理由のひとつとしてERAの場合でのC(2)酸素付加物の側鎖のヘミケタールの形成しにくさが推定されたが、この水素結合がこれを支持するデータのひとつになり得るものと考えられる。

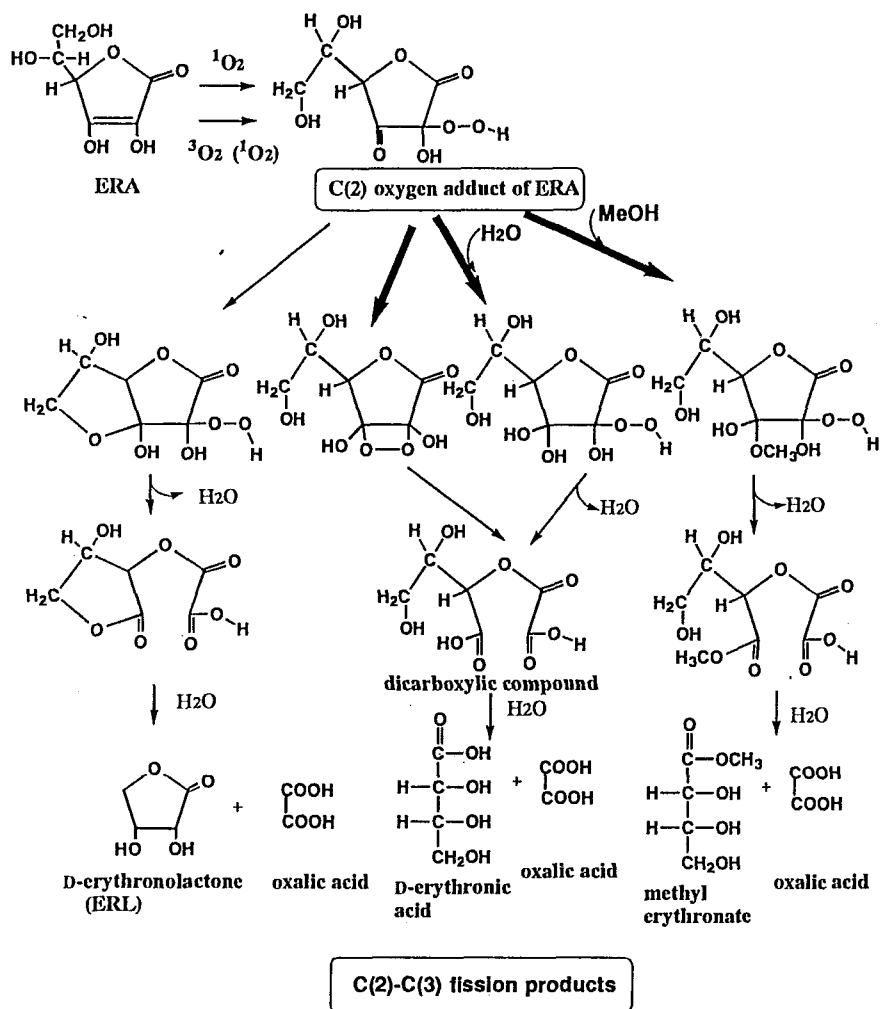
5.3.1.6 エリソルビン酸の自動酸化反応機構

以上本章で述べたように、ERAの自動酸化反応においても、DERAの他、ASAの場合と同様な生成物であるERL、エリスロン酸、エリスロン酸メチルエステル、OXAが生成することが認められた。また、その酸化反応過程において O_2^- の生成が確認され、その O_2^- の生成の程度がASAの場合とほぼ同じであったことと、ERAの残存率及び主要な酸化生成物と考えられるDERAの収率がASAの場合と同程度であったことから、ASAの場合と同様に、ERAのC(2)酸素付加物から O_2^- とモノデヒドロERAが生成したものと示唆された。DERAはこのモノデヒドロ型から主に不均化反応により生成すると考えられる。従って、ERAの自動酸化反応においても、ASAの場合と同様に、まず、ERAのC(2)酸素付加物が生成し、そこから一部はC(2)-C(3)結合の開裂を経て、ERL、OXA等が生成し、他方 O_2^- の脱離を伴い、モノデヒドロ型が生成し、さらに不均化反応により、DERAが生成するという経路が存在するものと推察された。(Scheme5-1参照) このように、前述のASAの反応機構は5位の炭素の水酸基の立体配置が異なる場合でも適用されることが明らかになった。しかしながら、その詳細は若



Scheme 5-1 Possible autoxidation pathway of ERA (I)

干異なり、ASAの非解離型においてはASAのC(2)酸素付加物から容易にbicyclicな構造をとるようになるため炭素4個から成るC4化合物としてTHLが生成されやすいが、ERAでは前述の酸素付加物のC(3)のカルボニル基とC(5)の水酸基との間の水素結合のためその側鎖が環を巻きにくく、従ってERLよりも鎖状構造のエリスロン酸やエリスロン酸のメチルエステルが生成しやすいものと示唆された。(Scheme5-2参照)



Scheme 5-2 Possible autoxidation pathway of ERA(II)

5.3.2 トリオースレダクトンの自動酸化反応

5.3.2.1 トリオースレダクトンの酸化分解反応

TRのメタノール中での自動酸化反応を行った場合のTR残存率をASAの場合と比較して、Fig. 5-9に示す。TRの残存率は反応時間30分で71.6%、60分で42.7%となり、ASAの場合のそれぞれ74.7%、50.2%に比較してやや低い傾向の残存率を示し、反応時間60分では5%の危険率でTRの方が残存率が有意に低かった。

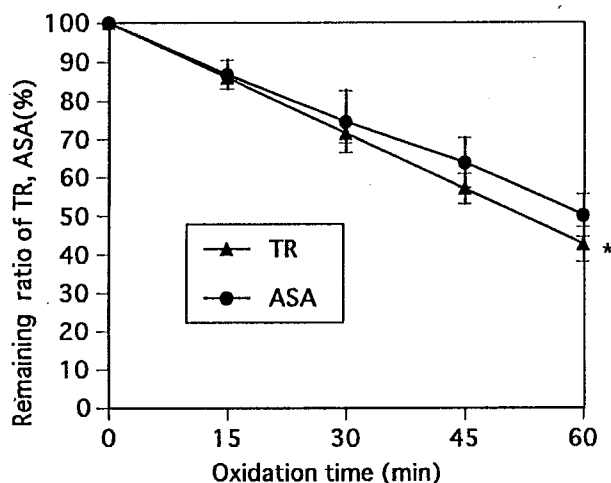


Fig.5-9 Degradation ratio of TR and ASA in MeOH

* $p < 0.05$, significantly different from ASA

Data represent means \pm SD (n=5) and expressed as a ratio, with the initial amounts of TR or ASA regarded as 100%.

TR or ASA concentration : $50 \mu\text{M}$

Reaction solution : MeOH

Reaction temperature : 25°C

TRの酸化反応をさらに詳しく調べるために、酸素ガスを通気せずに各種溶液中で自動酸化反応を行い、その酸化速度を種々の溶媒中で測定したが、そのうち 25°C で調べた結果をFig. 5-10に示す。TR分解速度はメタノール中 > 水中 > アセトニトリル中 > 希塩酸溶液中の順となり、反応時間60分におけるTR残存率はそれぞれ53.1%、65.7%、78.3%、97.6%であった。この分解のしやすさの順序は 30°C 、 40°C においても変わらなかった。それぞれの溶媒中におけるTRの減少は一次反応速度式に従うことが認められ、 25°C 、 30°C 、 40°C での反応速度定数と活性化エネルギーをまとめたのが、Table 5-3である。TRの 30°C での非解離型、モノアニオン型、ジアニオン型の速度定数は、それぞれ $3.6 \times 10^{-6} \text{sec}^{-1}$ 、 $7 \times 10^{-5} \text{sec}^{-1}$ 、 $1.8 \times 10^{-2} \text{sec}^{-1}$ であると報告されており[166]、今回観測された希塩酸溶液中及び水中での速度定数は $2.01 \times 10^{-5} \text{sec}^{-1}$ 、 $1.50 \times 10^{-4} \text{sec}^{-1}$ とやや高かった。メタノール中、水中、アセトニトリル中、希塩酸溶液中での活性化エネルギーはそれぞれ、10.16kcal/mol、12.26kcal/mol、6.45kcal/mol、27.92kcal/molであった。

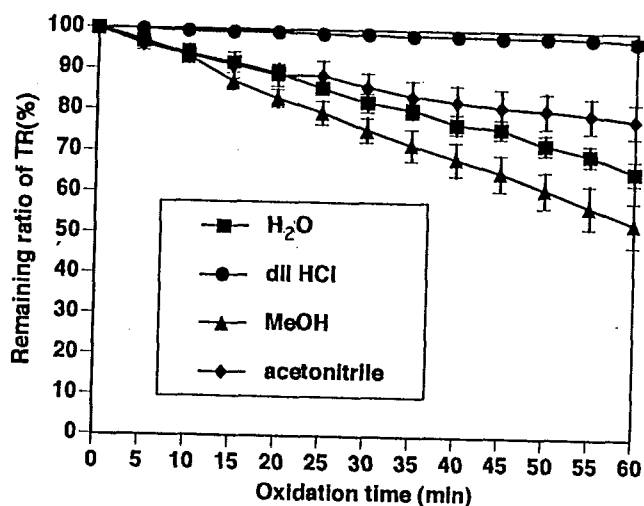


Fig. 5-10 Degradation ratio of TR in various solution

Data represent means \pm SD (n=4~6) and are expressed as a ratio, with the initial amounts of TR regarded 100%.

TR concentration ; 15 μ M

Reaction solution ; H₂O, dilute HCl, MeOH, acetonitrile

Reaction temperature ; 25°C

Table 5-3 Rate constant and activation energy for TR in various solution

	Rate constant (sec ⁻¹)			Activation energy (kcal/mol)
	25°C	30°C	40°C	
H ₂ O	1.07×10^{-4}	1.50×10^{-4}	2.99×10^{-4}	12.26
dil HCl solution	6.66×10^{-6}	2.01×10^{-5}	2.42×10^{-5}	27.92
MeOH	1.54×10^{-4}	1.98×10^{-4}	3.55×10^{-4}	10.16
acetonitrile	9.01×10^{-5}	1.06×10^{-4}	1.53×10^{-4}	6.45

concentration of TR ; 15 μ M

この種々の溶媒中における $15\ \mu\text{M}$ の濃度でのTR溶液の紫外部吸収極大はメタノール中、水中、アセトニトリル中、希塩酸溶液中でそれぞれ、275nm、290nm、263nm、265nmであった。すでに報告されているTRの紫外部吸収極大は、酸性溶液中(pH1.5~4.1)では268nm、中性から弱アルカリ性中(pH6.8~10.0)では293nm、強アルカリ性溶液中(pH>13.5)では323nmであり[166]、これらの値と比較すると、希塩酸溶液中(pH2.0)では酸性溶液中での値に近く、非解離型をとっていると考えられ、水中では中性から弱アルカリ性中での値に近いことから、解離型(モノアニオン)をとっていると考えられた。アセトニトリル中では非解離型での吸収極大に近いが、メタノール中では非解離型と解離型(モノアニオン)の中間の値であり、メタノール中で一部がモノアニオンの形をとっている可能性が示唆された。従って、メタノール中、水中で分解速度が大きかったのはTRがより不安定な解離型をとっている割合が大きかったためと考えられ、アセトニトリル中、希塩酸溶液中では非解離型をとっているためと推察された。また、もうひとつの要因としては第II章で述べた溶媒による溶存酸素濃度の違いが挙げられ、水中に比較してメタノール中での分解速度が大きいのもそのためと考えられる。

次にTRの酸化反応についてCVによる分析とMOPACのPM3法による計算を試みた。Fig. 5-11にTRのサイクリックボルタムグラムの一例を示す。これはpH7の水溶液中及びメタノール中での測定結果で、TRの場合もASAやERAと同様に酸化反応すなわちアノードのピークのみが観測され、電極での電気化学的な反応においては非可逆的であることが認められた。Table 5-4にTRの各溶液中で測定したCVのアノードのピーク電位とMOPACのPM3法で計算したTRの解離型及び非解離型のHOMOのエネルギーレベルを示した。TRについても水溶液中のアノードのピーク電位はpHが高いほど、低くなり酸化されやすいことが示唆された。また、HOMOのエネルギーレベ

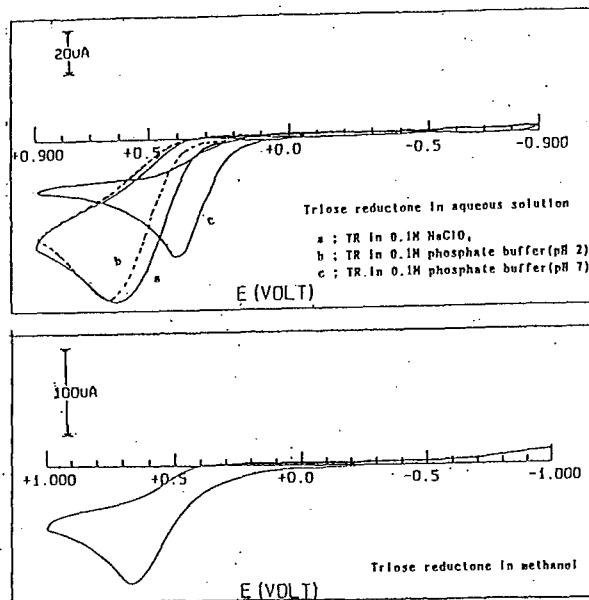


Fig. 5-11 Cyclic voltammograms of TR

[Condition of CV]

Working electrode; glassy carbon

Reference electrode ; Ag/AgCl (saturated NaCl)

Ag/Ag⁺(TBAP/acetonitrile)

Supporting electrolyte; 0.1M phosphate buffer(pH2. pH7)

0.1M NaClO₄

Scan rate; 250mV/sec

Table 5-4 Anodic peak potential by cyclic voltammerty and energy levels of HOMO by MOPAC of TR

	Anodic peak potential TR	Energy level of HOMO TR
	(mV vs. Ag/AgCl)*	(eV)
0.1M phosphate buffer (pH7)	415.4 ± 16.0	dissociated -2.79
0.1M NaClO ₄ (pH3.3)	595.6 ± 4.7	
0.1M phosphate buffer (pH2)	668.0 ± 15.1	non-dissociated -9.32
.....		
	(mV vs. Ag/Ag ⁺)*	
0.1M NaClO ₄ in MeOH	649.8 ± 15.9	

Means ± SD (n=6)

* Reference electrode

aqueous solution ; Ag/AgCl (saturated NaCl)

non-aqueous solution ; Ag/Ag⁺(TBAP/acetonitrile)

ルも解離型の方が非解離型よりも高くなり、CVの結果とも一致した。メタノール中でアノードのピーク電位は非水系の参照電極を基準として649.8mVとなり、ASAよりもやや高く、酸化分解の結果とは矛盾のある結果となってしまった。これには、CV測定と分解速度測定においてASA及びTRの濃度の差があることも原因のひとつとして挙げられる。HOMOのエネルギーレベルについては、解離型、非解離型ともにASAの場合 (Table5-1参照) よりも高い結果となり、TRの方が酸化されやすいことが示唆され、自動酸化分解反応の結果と一致した。このようにCVの結果

と酸化分解の結果に矛盾が生じた最大の理由は5.3.1.1のERAのところでも前述したように、自動酸化反応は酸素分子との反応であるのに対し、CV法は電極界面での電子の授受反応であるので、完全に同一の反応ではないことによるものであろう。

このようにTRとASAの安定性に差が見られるのには、ASAの還元性に最も寄与する部分構造はaci-reductone構造の特にエンジオール基であるが、エンジオール基を平面的cis型に保持するなどラクトン環や側鎖の部分も還元性の強さには関与していることを示唆しているものと考えられる。

5.3.2.2 トリオースレダクトンの酸化反応生成物

TRをメタノール中で120分間酸化反応を行い、HPLCにより分析した結果をFig. 5-12に示す。反応出発物質であるTRは標品ではRT 27分に溶出されたが、この試料中では検出されず、反応時間60分で約40%にまで分解されていることから推測して、この反応時間ではほとんど分解されてしまったためと考えられる。分解生成物としてはRT 18分、RT 24分のピークがそれぞれグリオキシル酸、ギ酸の標品とRTが一致したことから、グリオキシル酸及びギ酸がTRの酸化生成物として確認された。さらにグリオキシル酸については、TRのメタノール中での酸化生成物をMSTFAを用いてTMS誘導体にしGC分析も行った。その結果を、Fig. 5-13に示す。RT 21.2分のピークがグリオキシル酸のTMS誘導体の標品とRTとマススペクトルが一致し、グリオキシル酸のTMS誘導体であると同定された。ここにはデータを示さないが、薄層クロマトグラフィーを用いた分析により、酸化型TR、すなわちデヒドロTR(DR)がTRのメタノール中の酸化反応において生成することは確認した。TRの水溶液中での自動酸化分解生成物としてはギ酸とグリオキシル酸が報告されており[166]、ギ酸とグリオキシ

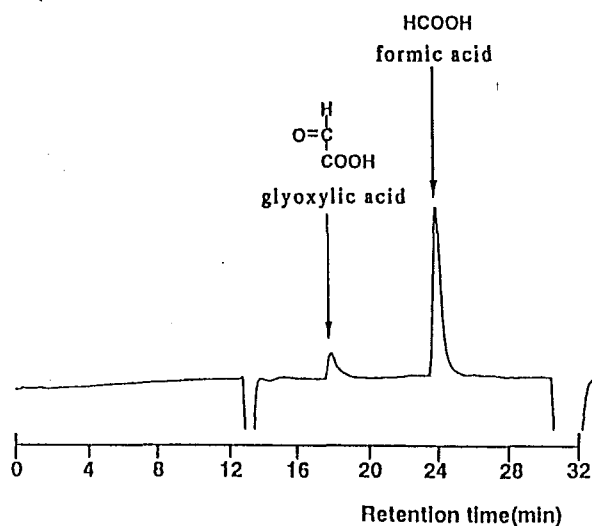


Fig. 5-12 High performance liquid chromatogram of oxidation products of TR in MeOH

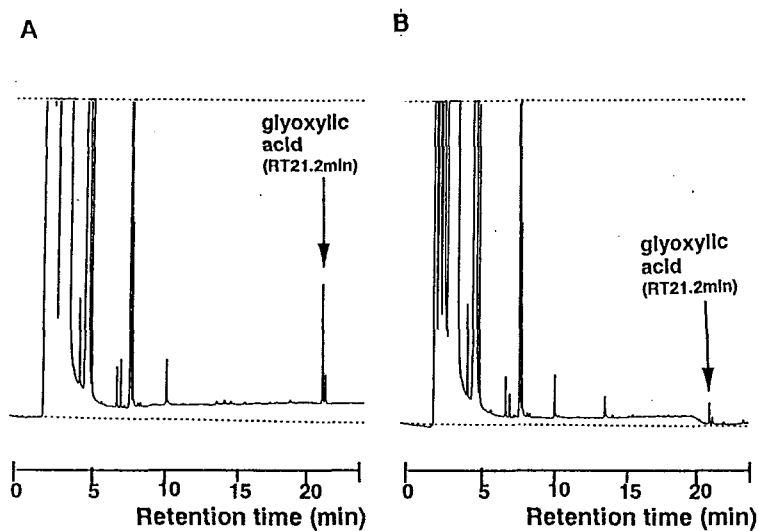


Fig. 5-13 Gas chromatograms of TMS derivatives of oxidation products of TR in MeOH

A ; glyoxylic acid standard,
 B ; oxidation products of TR in MeOH
 Reaction time ; 120min
 Reaction temperature ; 45°C
 TMS reagent ; MSTFA

ル酸の生成量の合計がモル数にして消失したTRの約2倍であり、ギ酸の生成量はグリオキシル酸の約5倍であったことから、その生成経路としては2段階の生成経路が推定されている。すなわち、TRからまずギ酸と

グリオキシル酸が生成し、さらにグリオキシル酸が分解されギ酸と二酸化炭素が生成するという経路が考えられている[166]。しかしながら、このTRの酸化分解経路の詳細は明らかになっていない。

5.3.2.3 TRの酸化反応における O_2^- の生成

TRのメタノール中での酸化反応における O_2^- の生成の可能性についてNBTを用いて調べた結果がFig. 5-14である。TRの場合の560nmでの吸光度はASAなどの場合に比較して低いものの、反応時間60分及び90分でそれぞれ0.005、0.013に上昇し、ホルマザンの生成が認められた。従ってTRのメタノール中での酸化反応においても、 O_2^- の生成が確認された。TRの水溶液中での酸化反応過程で、 H_2O_2 が生成するが、反応後期で消失してしまうことが報告されている[166]。この H_2O_2 は O_2^- から生成したとも考えられる。TRの場合、残存率ではASAなどと大きな差は認められなかったが、ホルマザンの生成がASAなどに比較して低かったのは、 O_2^- との反応性にASAとTRで差があり、生成した O_2^- がNBTと反応する割合がTRの場合低かった可能性も考えられる。

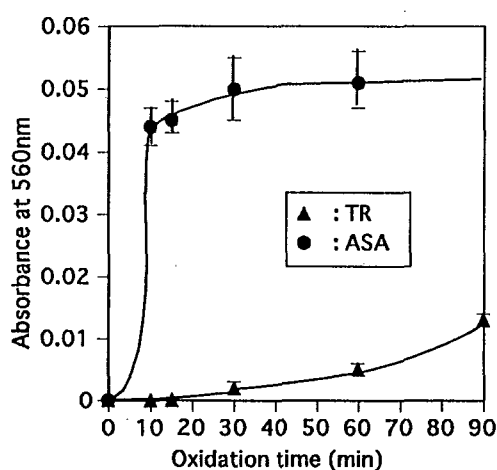


Fig.5-14 Reduction of NBT in the autoxidation of TR and ASA in MeOH

Values are means \pm SD(n=6).
TR, ASA concentration ; 50 μ M
NBT concentration ; 61 μ M
Reaction solution ; MeOH
Reaction temperature ; 25 $^{\circ}$ C

5.3.2.4 トリオースレダクトンの酸化反応についての分子軌道法による検討

TRの自動酸化反応の反応機構についてさらに詳しく調べるために計算化学的手法による検討を行った。TRと酸素分子の相互作用につき、ASAの場合と同様にMOPACのPM3法を用いて計算を行った。TRのモノアニオンの2位の炭素原子(C(2))に酸素分子を接近させていった場合のTRの解離型と酸素のsuper-moleculeについて計算を行った。Fig. 5-15はTRのアニオンに一重項酸素酸素を接近させた場合、すなわちRHFで計算したときのsuper-moleculeの生成熱の変化を表したもので、TRのC(2)と酸素分子との距離が2 Åよりも近づくと生成熱が20kcal/mol程度低くなり、反応が進みやすくなり、最終的にTR (アニオン) と酸素分子は結合し、その間の距離は1.42 Åであった。このTRのC(2)酸素付加物の生成熱は-155.93kcal/molであり、TRのC(2)の軌道が sp^2 混成軌道から、 sp^3 混成軌道に変化するためテトラヘドラルな構造をとるようになり、全体としてC(2)を中心に対称性に富んだ構造となっている。Fig. 5-16はこの時のTRのC(2)と酸素分子の正味の電荷の変化を示したものである。ASAの場合と同様にTRと酸素分子との距離が小さくなると酸素分子の負電荷が大きくなるのに対し、TRのC(2)の負電荷が小さくなる傾向が見られ、徐々にTRのC(2)の電子が酸素分子側に移動していくことが示唆された。このようにTRのC(2)と酸素分子との間に相互作用が生じてTRと酸素分子が結合するようになるものと考えられた。TRのC(2)酸素付加物では、C(2)の正味の電荷は0.121となったのに対し、付加した酸素分子の電荷は合計して-0.862と負電荷が大きかった。このようにTRのアニオンに酸素分子が接近すると、両者間の距離が3 Å以下程度に小さくなったころから、酸素分子が一重項酸素的な挙動を示すようになり、TRのC(2)酸素付加物が生成するものと考えられ、TRの場合にもASAの場合と同様な自動酸化

反応機構が存在することが示唆された。

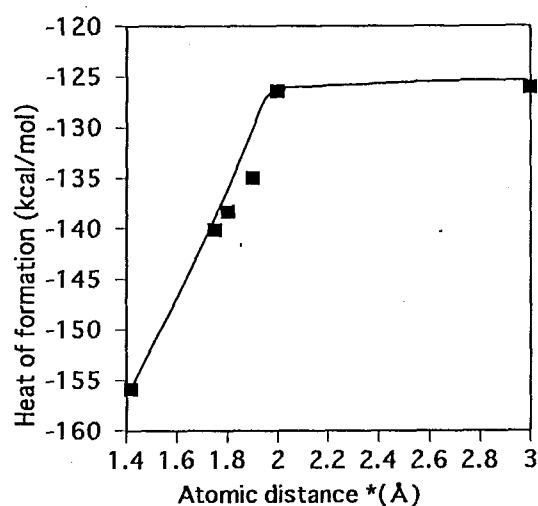


Fig. 5-15 Heat of formation of the supermolecule of TR anion with oxygen

*Distance between the C(2) of TR monoanion and the reacting oxygen atom of oxygen molecule. calculated by RHF-singlet

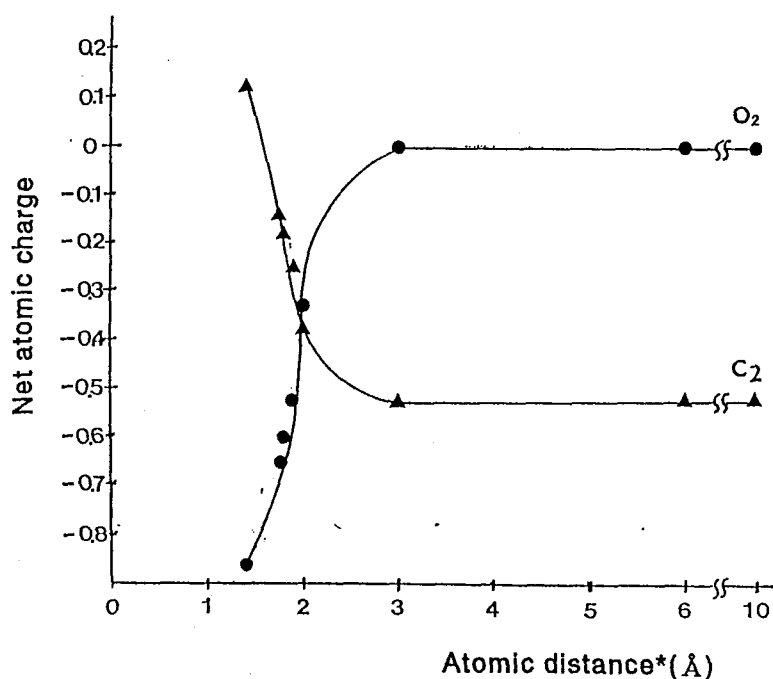
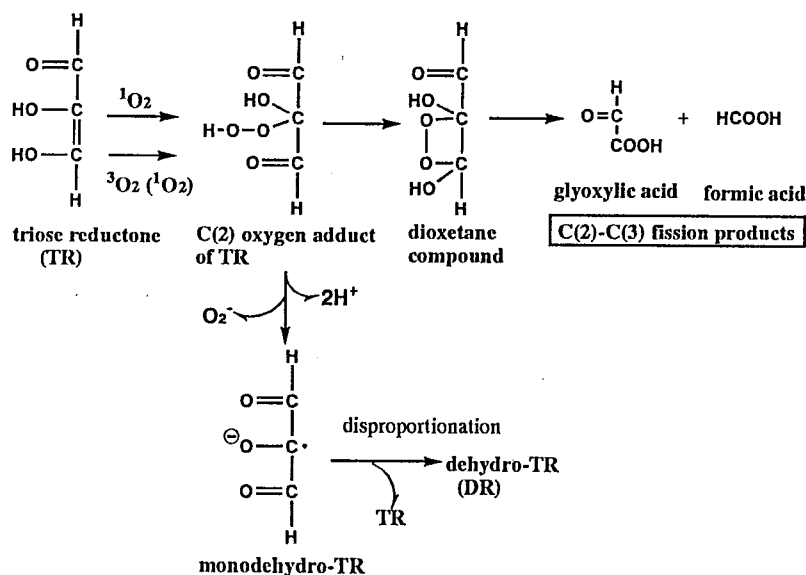


Fig. 5-16 Net atomic charges in various distance between the C(2) of TR (anion) and oxygen molecule

*Distance between the C(2) of TR monoanion and the reacting oxygen atom of oxygen molecule
Data represent the net atomic charges of the C(2) of TR and the oxygen molecule.

5.3.2.5 トリオースレダクトンの自動酸化反応機構

以上本章で述べたように、TRの自動酸化反応において、DRの他、ギ酸とグリオキシル酸が生成することが確認された。また、その酸化反応過程において O_2^- の生成することが確認された。MOPACのPM3法による計算結果でASAの場合と同様にTRのアニオンに酸素分子が接近すると一重項酸素的挙動を示すようになると考えられることから、このTRの自動酸化反応への一重項酸素の関与の可能性が示唆された。また、MOPACのPM3法による計算からTRのC(2)酸素付加物の生成の可能性も示されたことから、ASAの自動酸化反応と同様にTRの場合もC(2)酸素付加物を経由するという反応経路が考えられた。従って、TRの酸化生成物として確認されたギ酸とグリオキシル酸もScheme5-3に示すように、TRのC(2)酸素付加物の生成を経てC(2)-C(3)結合の開裂を伴い、生成したのではないかと推察された。また、他方TRのC(2)酸素付加物から O_2^- の脱離を伴い、モノデヒドロ型TRが生成し、さらに不均化反応により、DRが生成するという経路が考えられた。このように、第IV章で示したASAの自動酸化反応機構はASAの電子供与性に最も関与する部分構造そのもののみから成り立つ最も単純なaci-reductoneであるTRにおいても適用されることが明らかになった。



Scheme 5-3 Possible autoxidation pathway of TR

第VI章 総括

ASAは食品及び生体系において多様な機能を果たしているが、その反応機構などの詳細については未だ不明な点が多い。このようなASAの食品及び生体系における種々の機能の発現の解明の基礎としてASAの変化過程を明らかにすることは重要であると考えられる。ASAの重要な働きのひとつに抗酸化作用が挙げられるが、このASAの抗酸化作用の基礎となっているASAによる還元反応の際に不可避免的に見られる反応がASAの酸化反応である。ASAはMDASAへの一電子酸化を経て酸化していくことがよく知られているが、ASAの自動酸化反応、すなわちASAと酸素分子との反応の詳細については十分解明されていない。本研究においては、ASAの金属触媒非存在下における自動酸化反応機構の解明を目的とした。

まず、第II章ではASAの自動酸化反応速度を調べ、この酸化反応に及ぼす種々の要因について検討した。50 μ Mという希薄なASA溶液に室温下で酸素ガスを通気するという一定の方法で酸化反応を行った。金属触媒非存在下においてはASAの自動酸化速度は極めて低いが、まずASAの酸化反応の基礎となる金属触媒非存在下でのASAの自動酸化反応について調べた。また、従来ほとんど研究の行われてこなかった非水系でのASAの酸化反応についても検討することとし、メタノール中での反応を中心に、溶媒の種類、ASA初濃度、反応温度、光の有無、ASAの溶液中での存在形態などの影響について調べた。その結果、本実験条件ではメタノール、アセトニトリルなど溶媒中での反応速度は、純水中の場合に比較して大きく、これは反応溶液中の溶存酸素濃度の違いによるものと考えられた。また、メタノール中においてもASAの解離型の方が非解離型に比較して酸化を受けやすいことが認められた。反応系に共存する物質の影響については、主として金属イオンとタンパク質について検討した。ASAの酸化速度に最も大きな影響を及ぼす要因のひとつである金属イオンについ

ては、Fe(III)、Cu(II)を選び、水中及びメタノール中での反応を行いそれらの影響を調べた。金属イオン共存下により水中のみならずメタノール中においてもASAの酸化促進効果が観察された。Cu(II)の触媒効果は水中ではFe(III)より大きかったが、メタノール中では逆にFe(III)の方が大きく、溶媒の種類により触媒効果が異なることが認められた。タンパク質については還元性物質、糖類などと共にASAの酸化を抑制する因子のひとつであり、その反応機構については反応液中の微量金属をキレートするためと一般的には推定されているが、詳細は十分解明されていない。また、ASAの自動酸化反応過程において O_2^- が生成することから、SOD共存によりASAが安定化されるとの報告もある。そこで本研究では、活性酸素消去酵素からSODとCATを選び、それらのASAの酸化反応に対する影響と作用機構について考察した。その結果、SODのみならず、CATについてもASA酸化抑制効果が認められた。しかしこれとほぼ同程度のASA安定化効果はBSAやオボアルブミンなどの非酵素タンパク質においても認められ、さらに阻害剤や失活酵素を用いた実験などの結果から、SODによるASAの安定化には酵素の特異的作用の効果は確かに認められたが、CATについては酵素の特異的作用の寄与はかなり低いものと推定された。SOD、CATやその他非酵素タンパク質によるASAの安定化にはASAとタンパク質との非特異的な相互作用も関与している可能性が本研究により初めて明らかにされた。さらに、これらタンパク質の非酵素的な O_2^- 消去作用もASAの安定化に寄与している可能性も考えられた。

次に第三章ではASAの自動酸化反応生成物について調べた。特にASAと一重項酸素との酸化反応生成物として報告されているTHLとOXAが自動酸化反応においても生成するか否かという点に着目して検討した。まず、一重項酸素との反応に関する報告と同様にメタノール中で金属触媒非存在下で自動酸化反応を行ったところ、ASAの酸化反応生成物として従来

よく知られているDASA以外にTHLとOXAの生成がGC及びGC-MS分析により確認された。THLはアセトニトリルなど他の溶媒中のみならず、純水中においても生成することが認められた。食品・生体系でASAが多く存在する場である水系においてもTHL及びOXAが生成したことから、この反応が食品・生体系においても起こる可能性があることが示された。この反応について化学量論的に調べたところ、THL及びOXAの収率はDASAの収率の約12分の1と僅かであるが、量論的に決して無視できないことが示された。さらに、前述したように生体系、細胞内ではASAに比較してDASAの濃度は極めて低く、容易にASAに還元されることがよく知られており、最近、高等動物においてもDASAを還元する種々の酵素系が存在することが明らかにされてきている。従って、ASAの主要酸化生成物であると考えられるDASAも生体内では容易にASAに還元されることが推察され、結果としてASAの酸化生成物としてはTHLとOXAが主要であると考えられる。さらにこのTHL及びOXAは本実験条件下ではDASAやDKGからは生成しないことが確認されたことから、DASAを経由しない新たなASA酸化経路の存在が強く示唆された。従って、この反応が一重項酸素による酸化反応の場合と同様の反応経路をたどっている可能性が示された。さらに、第II章で示した種々の条件下でのTHLの収率を調べた。ASAの解離型ではTHLの収率は非解離型の場合に比べて低くなったが、OXAの収率は高いことから、THL以外の生成物の存在が示唆され、炭素4個からなる化合物としてスレオン酸、スレオン酸のメチルエステルなどが確認された。金属触媒の影響については、Fe(III)、Cu(II)共存下のメタノール中、水中のいずれの反応系においてもTHLの生成が認められ、金属触媒存在下においても非存在下での反応と同様の反応が起こることが示唆された。しかし、その収率はFe(III)共存下のメタノール溶液中においては、金属触媒非存在下の場合と同程度であったが、他のいずれの場合もTHLの収率は低かった。これは、金属触

媒共存の反応系では反応の進行と共に反応性の高い $\cdot\text{OH}$ が生成することから、この $\cdot\text{OH}$ とASAとの反応の影響が大きいのではないかと推定された。

$\cdot\text{OH}$ とASAの反応生成物としてはMDASAが最もよく知られていることから、MDASAから不均化反応により生成するDASAの収率が高くなり、従ってTHLの収率が低くなったのではないかと考えられた。

第IV章では、以上の結果をふまえて、ASAの自動酸化反応機構について、分析化学的手法、計算化学的手法を用いて、ASAの新たな自動酸化反応機構について検討した。まず、このASAの自動酸化反応への一重項酸素の関与の可能性について半経験的分子軌道法(MOPACのPM3法)を用いた計算と、重水を用いた実験の両面からの検討を行った。MOPAC(PM3法)によるASA(解離型)と酸素分子とをsuper-moleculeとして扱った計算では、ASA(解離型)と酸素分子との距離が非常に近くなると酸素分子の一重項酸素への励起に要するエネルギーが減少し、最終的にはASA(解離型)の酸素付加物が生成するものと考えられた。また、一重項酸素の寿命の長い重水(D_2O)中において水(H_2O)中の場合よりもTHLの収率が高かったことから、実験的にもこの反応への一重項酸素の関与の可能性が示唆された。さらに、ASAの自動酸化反応における O_2^- の生成とその生成機構について検討した。水溶液中でのASAの自動酸化反応における O_2^- の生成はすでに報告されているが、本研究においても追試を行ったところ、確かに O_2^- の生成は認められた。次にメタノール中の反応においても調べたところ、 O_2^- の生成が確認された。THL及びOXA生成反応においてASAのC(2)酸素付加物が反応中間体としてすでに示唆されていることから、この酸素付加物からの O_2^- の脱離の可能性についてMOPACのPM3法を用いて検討した。その結果ASAのC(2)酸素付加物からの O_2^- の脱離がエネルギー的に可能であることが示され、 O_2^- の生成経路においてもこのASAの酸素付加物は中間体として存在する可能性があることが強く示唆された。

これまでの実験及び計算結果よりASAの自動酸化反応経路として次のような推定反応経路が考えられた。すなわち、ASAは三重項酸素により酸化される際、まずASAのC(2)酸素付加物が中間体として生成するが、その過程で酸素分子は一重項酸素と同様な性質を帯びてくる可能性が示唆された。このASAのC(2)酸素付加物から、一部はC(2)-C(3)が開裂してTHL、OXA等が生成し、他方 O_2^- が脱離してMDASAが生成するという2つの経路に反応経路が分かれるものと考えられ、このMDASAからは不均化反応によりASAとDASAが生成する。この前者のTHL等を生成する経路は、 O_2^- の生成を伴いMDASAを生成する後者の経路に比較してその生成量は低いものの、DASAを経由せずにC(2)-C(3)の開裂が起こる新たな反応経路として大変興味深い。また、このTHL等を生成する経路は酸素と反応して反応性の低い非ラジカル化合物が生成されることから、いわばASAの抗酸化作用を示しているのに対して、 O_2^- を生成する経路は活性酸素を生成することからむしろ酸化促進作用を示していると考えられる。この反応機構は、大筋としては水、アセトニトリルなど他の溶媒系においても、またASAの溶液中での存在形態に関わらず、適用できると推察されたが、ASAのC(2)酸素付加物からbicyclicな構造への移行の難易など、若干異なる点が認められ、それが反応系による生成物のパターンの違いを反映しているものと考えられた。

最後に第V章においてASA関連化合物の自動酸化の際にもASAの場合と同様な自動酸化反応機構が関与し得るか否かについて検討した。ASA関連化合物としてASAの立体異性体であるERAと、最も単純なaci-reductoneであるTRを選び、そのメタノール中での自動酸化反応について調べた。それぞれについてASAの場合と同様に自動酸化反応を行い、その反応生成物を調べたところ、C(2)-C(3)開裂生成物と推定される生成物がそれぞれ分離・同定された。また、両反応系において O_2^- の生

成も確認され、さらにERA、TRについてもMOPACのPM3法による計算でASAの場合と同様の結果が得られた。従ってERA及びTRにおいてもASAの場合と同様の自動酸化反応経路が適用できることが示された。

本研究において提示した新たなASAの自動酸化反応経路はASAの酸素付加物を經由するという点で、新規性があると考えられる。また、従来必ず經由すると考えられてきたDASAを經由せずにASAのC(2)-C(3)の開裂を伴う反応経路が存在することはASAの酸化反応機構を考える上で非常に興味深い。本研究によりASAの自動酸化反応経路の概要が明らかにされたが、このことは、食品及び生体系においてASA分子が示す複雑な挙動を解明する上で不可欠なひとつの手がかりを与えるものであり、且つASAの食品及び生体系における抗酸化作用を中心とする多様な機能の発現過程の解析に資する貴重な基礎資料としても重要であると考えられる。

References

1. R. Myllylä, E-R Kuutti-Savolainen and K. I. Kivirikko, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **83**, 441-448 (1978).
2. R.L. Miller, *Arch. Biochem. Biophys.*, **147**, 339-342 (1971).
3. G.H. Wada, J. H. Fellman, T. S. Fijita, and E. S. Roth, *J. Biol. Chem.*, **250**, 6720-6726 (1975).
4. E.Y. Levin, B. Levenberg, and S. Kaufman, *J. Biol. Chem.*, **235**, 2080-2086 (1960).
5. S.A. Jenkins, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **77**, 1030-1035 (1977).
6. N. Kato, T. Okada, Y. Takeda, and A. Yoshida, *Nitr. Rep. Int.*, **15**, 125-130 (1977).
7. S.R. Lynch and J.D. Cook, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **355**, 32-44 (1980).
8. B. Leibovitz and B.V. Siegel, *Internat. J. Nutr. Res.*, **48**, 159-164 (1977).
9. A. Bendich, L. J. Machlin, and O. Scandurra, *Adv. in Free Rad. Biol. Med.*, **2**, 419-444 (1986).
10. E. Niki, *Am. J. Clin. Nutr.*, **54**, 1119S-1124S (1991).
11. H. Sies and W. Stahl, *Am. J. Clin. Nutr.*, **62**, 1315S-1321S (1995).
12. E. Niki, N. Noguchi, H. Tsuchihashi, and N. Gotoh, *Am. J. Clin. Nutr.*, **62**, 1322S-1326S (1995).
13. A. Szent-Györgyi, *Biochem. J.*, **22**, 1387-1409 (1928).
14. W.A. Waugh and C.G. King, *J. Biol. Chem.*, **97**, 325-331 (1932).
15. W.N. Haworth and E.L. Hirst, *J. Soc. Chem. Ind.*, **52**, 645-646 (1933).
16. H. von Euler and C. Martius, *Liebigs Ann. Chem.*, **505**, 73-87 (1933).
17. H. von Euler and H. Hasselquist, *Chem. Ber.*, **88**, 991-995 (1955).
18. B. G. Cox, W. Jedral, and J. Palou, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, **1988**, 733-740 (1988).
19. E. Niki, A. Kawakami, Y. Yamamoto, and Y. Kamiya, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **58**, 1971-1975 (1985).
20. T. Dora, G.W. Burton, and K.U. Ingold, *Biochim. Biophys. Acta*, **835**, 298-303 (1985).
21. D.C. Lieber, D.S. Kling, and D.J. Reed, *J. Biol. Chem.*, **261**, 12114-12119 (1986).
22. H. Wefers and H. Sies, *Eur. J. Biochem.*, **174**, 353-357 (1988).

23. M. Miki, T. Motoyama, and M. Mino, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **570**, 474-477 (1989).
24. R.H. Bisby and A. W. Parker, *Arch. Biochem. Biophys.*, **317**, 170-178 (1995).
25. J. Tsuchiya, T. Yamada, E. Niki, and Y. Kamiya, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **58**, 326-330 (1985).
26. E. Niki, T. Saito, A. Kawakami, and Y. Kamiya, *J. Biol. Chem.*, **259**, 4177-4182 (1984).
27. E. Niki, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **498**, 186-199 (1987).
28. P. Finholt, P.B. Paulssen, and T. Higuchi, *J. Pharm. Sci.*, **52**, 948-954 (1963).
29. 梶田武俊、*食品工誌*, **11**, 271-279 (1964).
30. A.R. Rogers and T.A. Yacomeni, *J. Pharm. Pharmac.*, **23**, 218S (1971).
31. S.M. Blang and B. Hajratwala, *J. Pharm. Sci.*, **61**, 556-562 (1972).
32. M.H. Eison-Perchonok and T.W. Downes, *J. Food Sci.*, **47**, 765-773 (1982).
33. S.H. Lee and T.P. Labuza, *J. Food Sci.*, **40**, 370-373 (1975).
34. L.U. Thompson and O. Fennema, *J. Agric. Food Chem.*, **19**, 121-124 (1971).
35. J.E. Fleming and K.G. Bensch, *Int. J. Peptide Protein Res.*, **22**, 355-361 (1983).
36. F.J. Baudelin and J.V. Tuschhoff, *J. Am. Pharm. Assoc. Sci. Ed.*, **44**, 241-244 (1955).
37. S.H. Lin and J. Agalloco, *Process Biochem.*, **14**, 22-32 (1979).
38. W.H. Kalus and W.G. Filby, *J. Vit. Nutr. Res.*, **55**, 85-89 (1985).
39. S. Lewin, in "Vitamin C, Its Molecular Biology and Medical Potential", ed. by S. Lewin, Academic Press, London, 1976, pp.1-125.
40. A.O. Dekker, R.G. Dickinson, *J. Am. Chem. Soc.*, **62**, 2165-2171 (1940).
41. M.M. Taqui Khan and A.E. Martell, *J. Am. Chem. Soc.*, **89**, 4176-4185 (1967).
42. G.A. Hamilton, *Advan. Enzymol. Relat. Areas. Mol. Biol.*, **32**, 55-96 (1969).
43. R.F. Jameson and N.J. Blackburn, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, **1976**, 534-541(1976).

44. R.F. Jameson and N.J. Blackburn, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, **1976**, 1596-1602 (1976).
45. D.M. Miler and G.R. Buettner, and D.S. Aust, *Free Radical Biol. Med.*, **8**, 95-108 (1990).
46. J. C. Bauernfeind, in "Ascorbic acid : Chemistry, Metabolism, and Uses," ACS Advances in Chemistry Series No.200, ed. by P.A. Seib and B.M. Tolbert, American Chemical Society, Washington, DC, 1982, pp.396-497.
47. M.M. Taqui Khan and A.E. Martell, *J. Am. Chem. Soc.*, **89**, 7104-7111(1967).
48. G.R. Buettner, *Free Rad. Res. Comms.*, **1**, 349-353 (1986).
49. G.R. Buettner, *J. Biochem. Biophys. Methods*, **16**, 27-40 (1988)
50. B.H. Bielski, in "Ascorbic acid : Chemistry, Metabolism, and Uses," ACS Advances in Chemistry Series No.200, ed. by P.A. Seib and B.M. Tolbert, American Chemical Society, Washington, DC, 1982, pp.81-100.
51. B.M. Tolbert and J.B. Ward, in "Ascorbic acid : Chemistry, Metabolism, and Uses," ACS Advances in Chemistry Series No.200, ed. by P.A. Seib and B.M. Tolbert, American Chemical Society, Washington, DC, 1982, pp.101-123.
52. Y. Yamamoto, M. Sato, and S. Ikeda, *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, **43**, 59-67 (1977).
53. W.W. Wells, D. P. Xu, Y. Yang, and P. A. Rocque, *J. Biol. Chem.*, **265**, 15361-15364 (1990).
54. W.W. Wells and D. P. Xu, *J. Bioenerg. Biomemb.*, **26**, 369-377 (1994).
55. E. Maellaro, B.D. Bello, L. Sugherini, A. Santucci, M. Comporti, and A.F. Casini, *Biochem. J.*, **301**, 471-476 (1994).
56. J. B. Park and M. Levine, *Biochem. J.*, **315**, 931-938 (1996).
57. Y. Kagawa, H.Takiguchi, and N. Shimazono, *Biochem. Biophys. Acta*, **51**, 413-415 (1961).
58. Y. Kagawa and H.Takiguchi, *J. Biochem.*, **51**, 197-203 (1962).
59. Y. Kagawa, H. Takiguchi, and N. Shimazomno, *Biochem. Biophys. Acta*, **43**, 348-349 (1960).
60. Y. Kagawa, *J. Biochem.*, **51**, 134-144 (1962).
61. J. Kanfer, G. Ashwell, and J.J. Burns, *J. Biol. Chem.*, **235**, 2518-2521 (1960).
62. K. Niemelä, *J. Chromatogr.*, **399**, 235-243 (1987).

63. D.B. Shin and M.S. Feather, *J. Carbohydr. Chem.*, **9**, 461-469 (1990).
64. M. G. López and M.S. Feather, *J. Carbohydr. Chem.*, **11**, 799-806 (1992).
65. M. Otsuka, T. Kurata, and N. Arakawa, *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 531-533 (1986).
66. H. Tanaka and E. Kimoto, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **63**, 2569-2572 (1990).
67. S.K. Grandhee and V. M. Monnier, *J. Biol. Chem.*, **266**, 11649-11653 (1991).
68. S.H. Slight, M.S. Feather, and B.J. Ortwerth, *Biochem. Biophys. Acta*, **1038**, 367-374 (1990).
69. R. H. Nagaraj. and V. M. Monnier, *Biochem. Biophys. Acta*, **1116**, 34-42 (1992).
70. B.J. Ortwerth, S.H. Slight, M. Prabhakaram, Y. Sun, and J.B. Smith, *Biochem. Biophys. Acta*, **1117**, 207-215 (1992).
71. 大柳善彦, 「活性酸素と病気」化学同人, 京都, pp.1-20 (1989).
72. 二木悦雄, 「活性酸素種の化学」季刊化学総説 No.7, 日本化学会編, 学会出版センター, 東京, pp.177-190 (1990).
73. 二木悦雄, 「抗酸化物質—フリーラジカルと生体防御」二木悦雄, 島崎弘幸, 美濃真編, 学会出版センター, 東京, pp.3-15 (1994).
74. E. Cadenas, in "Oxidative Stress and Antioxidant defences in Biology", ed. by S. Ahmad, Chapman & Hall, New York, 1995, pp.1-46
75. 水上茂樹, 「活性酸素と栄養」, 水上茂樹, 五十嵐脩編, 光生館, 東京, pp.13-35 (1995).
76. 寺尾純二, *活性酸素・フリーラジカル*, **2**, 232-237 (1991).
77. 山本順寛, *活性酸素・フリーラジカル*, **2**, 247-253 (1991).
78. 二木悦雄, *ビタミン*, **62**, 601-619 (1988).
79. C.K. Chow, *Free Radicals Biol. Med.*, **11**, 215-232 (1991).
80. N.I. Krinsky, *Free Radicals Biol. Med.*, **7**, 617-635 (1989).
81. R.E. Beyer, *Free Radicals Biol. Med.*, **8**, 545-565 (1990).
82. J.E. Packer, T.F. Slater, and R.L. Willson, *Nature*, **278**, 737-738 (1979).
83. J. Tsuchiya, T. Yamada, E. Niki, and Y. Kamiya, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **58**, 326-330 (1985).
84. E.Niki, A. Kawakami, Y. Yamamoto, and Y. Kamiya, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **58**, 1971-1975 (1985).

85. 米井脩治, 泉忠秀, *蛋白質・核酸・酵素*, **33**, 3169-3177 (1988).
86. B. Frei, L. England, and B.N. Ames, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 6377-6381 (1989).
87. 二木悦雄, 「活性酸素—生物での生成・消去・作用の分子機構」, 中野稔, 浅田浩二, 大柳善彦編, 共立出版, 東京, pp.321-326 (1988).
88. M. Nishikimi, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **63**, 463-468 (1975).
89. D. E. Cabell and B.H.J. Bielski, *J. Phys. Chem.*, **87**, 1809-1812 (1983).
90. H. Hemilä, P. Roberts, and M. Wikstöm, *FEBS Lett.*, **178**, 25-30 (1984).
91. D.T. Sawyer, R. Chiericato, and T. Tsuchiya, *J. Am. Chem. Soc.*, **104**, 6273-6278 (1982).
92. I. B. Afanas'ev, V.V. Grabovetskii, and N.S. Kuprianova, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II*, **1987**, 281-285 (1987).
93. B.H.J. Bielski and H.W. Richter, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **258**, 231-237 (1975).
94. Y. Abe, S. Okada, R. Nakao, T. Horii, H. Inoue, S. Taniguchi, and S. Yamabe, *J. Chem. Perkin Trans. 2*, **1992**, 2221-2232 (1992).
95. P.-T. Chou and A.U. Khan, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **115**, 932-937 (1983).
96. M.L. Rooney, *Photochem. Photobiol.*, **38**, 619-621 (1983).
97. B.-M. Kwon and C.S. Foote, *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 6582-6583 (1988).
98. B.-M. Kwon, C.S. Foote, and S.I. Khan, *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 854-1860 (1989).
99. A. A. Frimer and P. Gilinsky-Sharon, *J. Org. Chem.*, **60**, 2796-2801 (1995).
100. P.S. Devamanoharan, S.M. Morris, and S. D. Varma, *Mol. Cell. Biochem.*, **156**, 131-134 (1996).
101. M. Scarpa, R. Stevanato, P. Viglino, and A. Rigo, *J. Biol. Chem.*, **258**, 6695-6697 (1983).
102. 斉藤烈, 松郷誠一, 「活性酸素—生物での生成・消去・作用の分子機構」 中野稔, 浅田浩二, 大柳善彦編, 共立出版, 東京, pp.13-25(1988).
103. B. Peterkofsky and W. Prather, *J. Cell physiol.*, **90**, 61-70 (1977).
104. B.Y.J.T. Yue, R. Niedra, and J.L. Baum, *Invest. Ophthalmol Vis. Sci.*, **19**, 1471-1476 (1980).
105. H.D. Jampel, *Arch. Ophthalmol.*, **108**, 1323-1325 (1990).

106. N. Arakawa, S. Nemoto, E. Suzuki, and M. Otsuka, *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **40**, 2219-227 (1994).
107. 柏村直樹, 森田潤司, *有合化*, **42**, 523-535 (1984).
108. H.P. Misra and I. Fridovich, *J. Biol. Chem.*, **247**, 3170-3175 (1972).
109. W. Bors, C. Michel, M. Saran, and E. Lengfelder, *Biochim. Biophys. Acta*, **540**, 162-172 (1978).
110. 山崎勇夫, 中村正雄, *蛋白質・核酸・酵素*, **33**, 1399-1404 (1988).
111. G.R. Buettner and B.A. Jurkiewicz., *Radiation Res.*, **145**, 532-541 (1996).
112. 中野稔, 「抗酸化物質—フリーラジカルと生体防御」 二木悦雄, 島崎弘幸, 美濃真編, 学会出版センター, 東京, pp.29-44 (1994).
113. M. Levine and K. Morita, *Vitamins and Hormones*, **42**, 1-64 (1985).
114. R.A. Løvstad, *Int. J. Biochem.*, **19**, 309-313 (1987).
115. 山内修二, 二村典行, 木下俊夫, *薬誌*, **113**, 385-390 (1993).
116. L. Liu, K. Dabrowski, and A. Ciereszko, *Mol. Cell. Biochem.*, **148**, 59-66 (1995).
117. 化学便覧, 改訂4版, 基礎編II, 日本化学会編, 丸善, 東京, pp.156-160 (1993).
118. J.S. Lawendel, *Nature*, **180**, 434-435 (1957).
119. Y. Abe, S. Okada, H. Horii, S. Taniguchi, and S. Yamabe, *J. Chem. Parkin Trans II*, **1987**, 715-720 (1987).
120. 川岸舜朗, 内田浩二, *フリーラジカルの臨床*, **7**, 27-33 (1993).
121. D. Klug, J. Rabini, and I. Fridovich, *J. Biol. Chem.*, **247**, 4839-4842 (1972).
122. H.S. Isbell and H.L. Frush, *Carbohydr. Res.*, **72**, 301-304 (1979).
123. P.O. Kvernberg and B. Pedersen, *Acta Chem. Scand.*, **48**, 646-651 (1994).
124. 浅田浩二, *生化学*, **48**, 226-257 (1976).
125. B. Halliwell and J.M.C. Gutteridge, in "Free Radicals in Biological Systems" ed. by B. Halliwell and J.M.C. Gutteridge, Oxford Science Publications, Clarendon Press, Oxford, 1985.
126. E.K. Hodgson and I. Fridovich, *Biochemistry*, **14**, 5294-5299 (1975).
127. E.K. Hodgson and I. Fridovich, *Biochemistry*, **14**, 5299-5303 (1975).
128. K. Uchida and S. Kawakishi, *J. Biol. Chem.*, **269**, 2405-2410 (1994).

129. E. Meucci, A. Mordente, G.E. Martorana, G.A.D. Miggiano, S. A. Santini, and A. Castelli, *Acta Med. Rom.*, **25**, 156-167 (1987).
130. 江畑信子, お茶の水女子大学卒業論文, 1996.
131. E.R. Stadtman, *Am. J. Clin. Nutr.*, **54**, 1125S-11128S (1991).
132. W.K.M. Chan, E.A. Decker, J.B. Lee, and D.A. Butterfield, *J. Agric. Food Chem.*, **42**, 1407-1410 (1994).
133. K. Mitsuta, Y. Mizuta, M. Kohno, M. Hiramatsu, and A. Mori, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **63**, 187-191 (1990).
134. M. Ohmori and M. Takagi, *Agric. Biol. Chem.*, **42**, 173-174 (1978).
135. F.W. McLafferty and D.B. Strauffer, in "The Wiley/NBS Registry of Mass Spectral Data", vol. 1~7, A Wiley-Interscience Publication, John Wiley & Sons, New York, 1974.
136. The Mass Spectrometry Data Center, in "Eight Peak Index of Mass Spectra", 3rd ed., vol. 1~3, The Royal Society of Chemistry, The University, Nottingham, 1986.
137. 西川陽子, 三宅紀子, 倉田忠男, ビタミン, **70**, 198 (1996), 日本ビタミン学会第48回大会講演要旨集.
138. G. Petersson, O. Samuelson, K. Anjou, and E. von Sydow, *Acta Chem. Scand.*, **21**, 1251-1256 (1967).
139. A.G. Sharkey, Jr., R.A. Friedel, and S.H. Langer, *Anal. Chem.*, **29**, 770-776 (1957).
140. D.C. DeJongh, T. Radford, J.D. Hribar, S. Hanessian, M. Bieber, G. Dawson, and C.C. Sweeley, *J. Am. Chem. Soc.*, **91**, 1728-1740 (1969).
141. A.E. Martell, in "Ascorbic acid : Chemistry, Metabolism, and Uses," ACS Advances in Chemistry Series No.200, ed. by P.A. Seib and B.M. Tolbert, American Chemical Society, Washington, DC, 1982, pp.153-178.
142. D. Bellus, *Adv. Photochem.*, **11**, 105-202 (1979).
143. M.A. J. Rodgers, *J. Am. Chem. Soc.*, **105**, 6201-6206 (1983).
144. C. Beauchamp and I. Fridovich, *Anal. Biochem.*, **44**, 276-287 (1981).
145. T. Clark, 「計算化学ガイドブッカー 3 大分子計算プログラムの解説一」, 大澤映二, 田辺和俊, 水野正城, 杉江正昭共訳, 丸善, 東京, pp.89-140 (1988).
146. J.M. MacCord and I. Fridovich, *J. Biol. Chem.* **244**, 6049-6055 (1969).

147. J.R. Harbour, V. Chow, and J.R. Bolton, *Can. J. Chem.*, **52**, 3549-3553 (1974).
148. M. Kohno, M. Yamada, K. Mitsuta, Y. Mizuno, and T. Yoshikawa, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **64**, 1447-1453 (1991).
149. Y. Ushijima, M. Nakano, *J. Appl. Biochem.*, **2**, 138-151 (1980).
150. P. C. Chan, B. H. J. Bielski, *J. Biol. Chem.*, **245**, 1317-1319 (1974).
151. B. H. J. Bielski, P. C. Chan, *J. Biol. Chem.*, **250**, 318-321 (1975).
152. J. Rabani, W. A. Mulac, and M. S. Matheson, *J. Phys. Chem.*, **69**, 53-70 (1965).
153. B. H. J. Bielski, G. G. Shiue, and S. Bajuk, *J. Phys. Chem.*, **84**, 830-833 (1980).
154. R. N. Feinstein and R. Lindahl, *Anal. Biochem.*, **56**, 353-360, (1973).
155. H. von Euler and H. Hasselquist, *Arkiv. Kemi. Mineral Geol.*, **26A**, No.25, 18 (1949).
156. 安茂寿夫, 和志武三徳, 林英文, 高橋充子, *薬誌*, **91**, 444-453 (1971).
157. J. Zak and T. Kuwana, *J. Am. Chem. Soc.*, **104**, 5514-5515 (1982).
158. G.N. Kamau, W.S. Willis, and J.F. Rusling, *Anal. Chem.*, **57**, 545-551 (1985).
159. D.T. Fagan, I-F. Hu, and T. Kuwana, *Anal. Chem.*, **58**, 3235-3239 (1986).
160. M. Poon, R.L. McCreery, and R. Engstrom, *Anal. Chem.*, **60**, 1725-1730 (1988).
161. G. Dryhurst, K.M. Kadish, F. Scheller, and R. Renneberg, in "Biological Electrochemistry", Vol.1, Academic Press, New York, 1982, pp.256-278.
162. P.T. Kissinger, C.R. Preddy, R.E. Shoup, and W.R. Heineman, in "Laboratory Techniques in Electroanalytical Chemistry", ed. by P.T. Kissinger and W.R. Heineman, Marcel Dekker, Inc., New York, 1984, pp.9-49.
163. E.N. Iheanacho, N.H. Hunt, and R. Stocker, *Free Radical Biol. Med.*, **18**, 543-552 (1995).
164. 安茂寿夫, 和志武三徳, 林英文, *薬誌*, **93**, 1545-1553 (1973).
165. 永嶋須美枝, お茶の水女子大学家政学研究科修士論文, 1995.
166. Y. Abe, H. Horii, S. Taniguchi, K. Kamai, and M. Takagi, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **56**, 467-470 (1983).

謝辞

本研究の遂行にあたり、終始ご懇切なご指導とご鞭撻を賜りましたお茶の水女子大学人間文化研究科 倉田忠男教授に深く感謝申し上げます。

また、本論文をまとめるのに際し、ご指導並びにご鞭撻を頂きました五十嵐脩教授、荒川信彦教授、清水碩教授、平野恒夫教授に厚く御礼申し上げます。さらに、博士課程を進めるにあたり、研究指導していただきました加賀秀夫教授に心より感謝の意を表します。

本研究の実施に際し、有益なご助言、ご助力を下さいました鳥取大学教育学部 大塚譲助教授、お茶の水女子大学生活科学部 鈴木恵美子助教授に心から御礼申し上げます。

溶媒中の金属イオンの分析、シュウ酸の定量法及びトリオースレダクトンのHPLCによる分析法でお世話になりました(株)島津製作所に厚く御礼申し上げます。

本研究の実施にあたり、ご指導、ご助言を下さいました生活環境研究センター並びに生活科学部食物科学講座の先生方に心より御礼申し上げます。

本論文の作成にあたり、常に暖かく協力してくれました生活環境研究センター第3部門の皆様心より感謝いたします。

1997年2月22日

三宅紀子