

2,3-ジケト-L-グルン酸のカルボニル基に起因する 直流ポーラログラフ還元波

中田 邦彦, 小田 健司, 森田 尚文^{®*},
澤田 恵夫^{**}, 高木正之助^{***}

(1992年10月5日受理)

各種緩衝液中での直流ポーラログラフの還元波に及ぼす 2,3-ジケト-L-グルン酸 (DKG) のカルボニル基の水和及びカルボキシル基の解離について検討を行った。酸性、中性、アルカリ性の各種 pH の緩衝溶液中における DKG の直流ポーラログラムから 3 種の異なった還元波 A, B, C が観察された。酸性溶液では、還元波 A ($E_{1/2} = -0.63$ V vs. SCE, pH 4.0) のみが大きく認められ、中性溶液では減少するが、新たに還元波 B ($E_{1/2} = -1.11$ V vs. SCE, pH 6.5) が大きくなった。アルカリ性溶液中では、還元波 B の減少に伴い、還元波 C ($E_{1/2} = -1.02$ V vs. SCE, pH 10.8) が認められた。サイクリックボルタンメトリーではこれらの還元波に対応する酸化ピークは認められず、非可逆反応であった。又、無酸素中性及びアルカリ性溶液中で DKG から二つのエンジオール型のジケトグルノ- δ -ラクトンは、中性溶液中では 3,4 型が、アルカリ性溶液中では 2,3 型のものが多く生成された。これらのことより、酸性溶液中で認められる還元波は DKG の一つのカルボニル基が水和したものの、中性溶液中のそれはカルボキシル基が解離型でカルボニル基が水和したもの、アルカリ性溶液中では、カルボキシル基が解離し、かつカルボニル基の非水和に対応した DKG に由来する還元波と結論される。

1 緒 言

L-アスコルビン酸 (AsA) は人間の生体内で比較的に大量に必要とされるビタミンであり、生体内酸化還元に関与すると考えられているが、その生理的な意義についてはいまだ十分には明らかにされていない¹⁾²⁾。これは AsA は中性からアルカリ性の水溶液中ではかなり不安定であり、酸素、紫外線などの存在下で容易に酸化されデヒドロアスコルビン酸 (DHA) となり、更にその環状構造が切断され、2,3-ジケト-L-グルン酸 (DKG) となるためと考えられている^{3)~5)}。この DKG はその分子中にカルボニル基を 2 個有し、水溶液中では容易に水和しているが、AsA, DHA に比べて、更に不安定で、酸化反応、重合反応を伴って分解、褐変反応が急速に進行する⁶⁾。この不安定性のため、DKG のカルボニル基の酸化還元反応についての研究はほとんど行われて

いない。

DKG の前駆体である DHA は AsA と共に特殊な酸化還元系を有しており、直流ポーラログラム上に反応電流の性質をもつ濃度に比して小さな還元限界電流を示すことが認められている⁷⁾。すなわち、水溶液中ではそのカルボニル基が水和しているため、水和型からの脱水反応が電極表面での反応の律速過程となっていることによると考えられている⁷⁾。又、DHA の 3 位のカルボニル基の水和による水酸基は 6 位のアルコール性の水酸基との間で脱水縮合しヘミケタール環を形成しているという報告もある⁸⁾。これらの点に着目して、本研究では DHA とは異なり環状構造をもたない DKG の水溶液中での異性化反応及びカルボニル基の水和反応を研究する一環として DKG の直流ポーラログラフによる検討を行うとともに、サイクリックボルタンメトリーなども用いて、そのカルボニル基の電極酸化還元反応の可逆性を検討した。更に、DKG は中性溶液中に放置すると異性化反応を起こし新たな六員環の δ ラクトン構造を有する還元性物質を生成することが報告されている⁹⁾¹⁰⁾。この異性化反応と DKG の電極還元反応についても検討を行った。

* 大阪府立大学農学部農芸化学科: 593 大阪府堺市学園町 1-1

** 近畿大学理工学部化学科: 577 大阪府東大阪市小若江 3-4-1

*** 関西大学工学部生物工学科: 564 大阪府吹田市山手町 3-3

2 実験

2・1 試薬及び試料の調製

AsA は和光純薬工業製の特級試薬を用いた。その他の試薬は市販の特級試薬を用いた。DKG は香川らの方法¹¹⁾によりカリウム塩として調製した。

2・2 緩衝液の調製

使用した緩衝液は pH 4 までは 0.1 M 酢酸緩衝液, pH 4 から pH 8 までは 0.1 M McIlvaine 緩衝液, pH 9 から pH 11 までは 0.1 M $\text{NH}_4\text{OH-NH}_4\text{Cl}$ 緩衝液を用いた。

2・3 装置及び測定条件

直流ポーラログラフの測定¹²⁾¹³⁾には、あらかじめ、各種緩衝液に窒素ガスを 10 分以上通気しながら酸素を除き、これに DKG を加え、その最終濃度が 5 mM となるように調製したものをを用いた。ポーラログラフの装置は、柳本製 Yanagimoto voltammetric analyzer P-1000 を用いた。水銀だめの高さは 60 cm, 参照電極は飽和カロメル電極 (SCE) を用いた。水銀滴下電極の特性は、蒸留水中開回路において水銀流出速度 (m) = 1.45 mg/s, 滴下時間 (t) = 4.25 s であった。加電圧掃引速度は 2 mV/s で行い、測定は $25 \pm 0.1^\circ\text{C}$ で行った。

サイクリックボルタンメトリーは、Universal programmer を装備した Princeton Applied Research 製 Polarographic analyzer (303 型) を用い参照電極には Ag/AgCl 電極を使用した。掃引速度は 10 mV/s, 水銀吊り下げ電極の 1 滴の表面積は、 1.7 mm^2 であった。

2・4 紫外吸収スペクトル

紫外吸収スペクトルの経時的な変化の測定には、DKG が 1 mM となるように 0.1 M の緩衝液に溶解したものを $25 \pm 0.1^\circ\text{C}$ で放置し、10 分ごとに吸光度を測定した。分光光度計は島津製 UV-3100 を用い、光路長 0.5 cm のフローセルを用いた。

3 結果及び考察

3・1 直流ポーラログラフ

pH 4.0, 6.5, 10.8 の各種 pH の無酸素緩衝液に DKG を溶解した直後の直流ポーラログラムを Fig. 1 に示す。

酸性溶液 (pH 4.0) では、一つの還元波 A ($E_{1/2} = -0.63 \text{ V vs. SCE}$) のみが認められた。又、弱酸性溶液

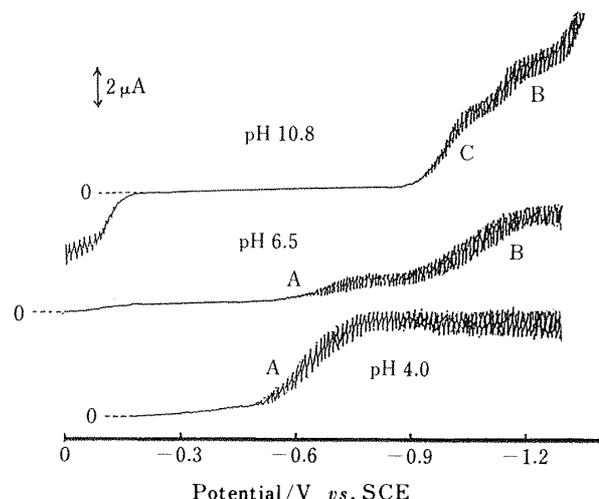


Fig. 1 D.c. polarograms of DKG in various pH solutions.

Concentration of DKG: 5 mM

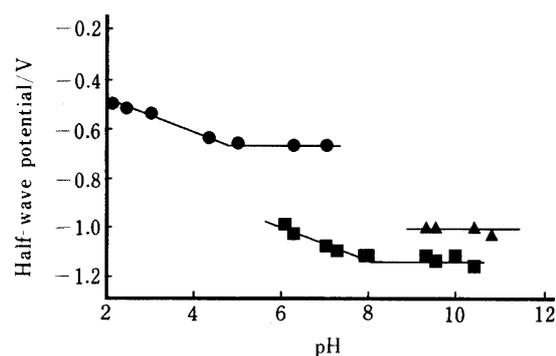


Fig. 2 pH dependence of half-wave potential of reduction waves obtained from various DKG solutions

●: wave A; ■: wave B; ▲: wave C

(pH 6.5) では還元波 A ($E_{1/2} = -0.67 \text{ V}$) 以外に新たな還元波 B ($E_{1/2} = -1.11 \text{ V vs. SCE}$) が認められた。アルカリ性溶液 (pH 10.8) では、還元波 A は認められず還元波 B と、更にこのものより正電位の新たな還元波 C ($E_{1/2} = -1.02 \text{ V}$) が認められた。又、pH 10.8 の直流ポーラログラムの酸化波 ($E_{1/2} = -0.15 \text{ V}$) は既に報告したようにエンジオール型の異性体のものと考えられる¹⁴⁾。

Fig. 2 は、これら三つの還元波 (A, B, C) について pH と半波電位の関係を示したものである。還元波 A の半波電位は、pH 4.3 までは pH の増加につれ負側にシフトしている (-0.073 V/pH) が、それ以降は一

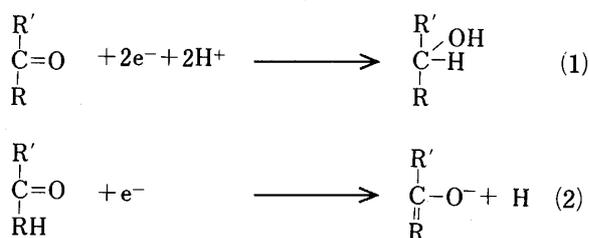


Fig. 3 Proposed mechanism of reduction of carbonyl group of DKG

定の電位 (-0.67 V) を示した. 一方, 還元波 B は, pH 8.0 までは pH の増加につれ半波電位は負側にシフトしており, その変化の程度は, pH 4.5 までの酸性溶液中における還元波 A のものと一致している. それ以降は, 一定の電位 (-1.15 V) を示した. 還元波 C は pH の変化に関わらず一定の電位を示した (-1.02 V). これらの A, B, C の還元波を示すカルボニル基の電極還元反応は, Fig. 3 に示したように 2 電子反応で水素イオンが二つたずさわる電極反応(1)と単に電荷の移動によるもの(2)との 2 種類の電極反応が考えられる. すなわち, 還元波 A については pH 4.5 付近までの水素イオン濃度が高い状態では, (1)に示したような水素イオンを必要とする電極反応を行い, 更に, pH が高くなり水素イオンの少ない状態では電子の授受のみが関与する(2)の反応が起こると考えられる. このことは, 還元波 B についても同じように, pH 8.0 付近までは pH の増加に伴い, 半波電位は負の方向に移動するが, 更に pH が増加しても, 半波電位は変わらないことにより, 上述の還元波 A と同様な電極反応を行うと考えられる. 又, 還元波 C においては, pH にかかわらず一定電位を示すことより(2)の電極反応のみが行われているものと考えられる. 次に, Fig. 4 に pH と還元波 A, B, C の限界電流値の関係を示す. 還元波 A の限界電流値は pH 4.5 で最大値を示した. それ以上の pH では減少し, pH 8.0 付近で認められなくなる. 一方, 還元波 B は pH 6 付近から認められ, pH 8.0 付近で還元波 A とほぼ同程度の限界電流値をとり, それ以上の pH の上昇とともに減少した. 更に, アルカリ性溶液中では, 還元波 B の他に還元波 C が認められるが, pH の上昇とともに増加し, pH 10 付近で最大値を示し, 更に pH が上昇すると減少する. 又, pH 4.5 以下で DKG の還元波の限界電流値が小さくなるのは, DKG の分解によるものではなく, 水素イオン濃度が高いため, DKG の二つのカルボニル基が水和し, 電極還

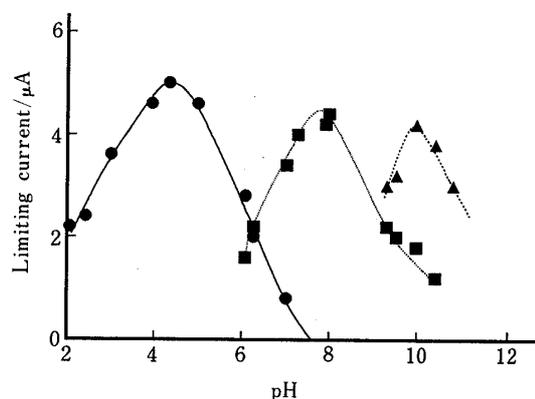


Fig. 4 pH dependence of limiting current of reduction waves obtained from DKG solutions

●: wave A; ■: wave B; ▲: wave C

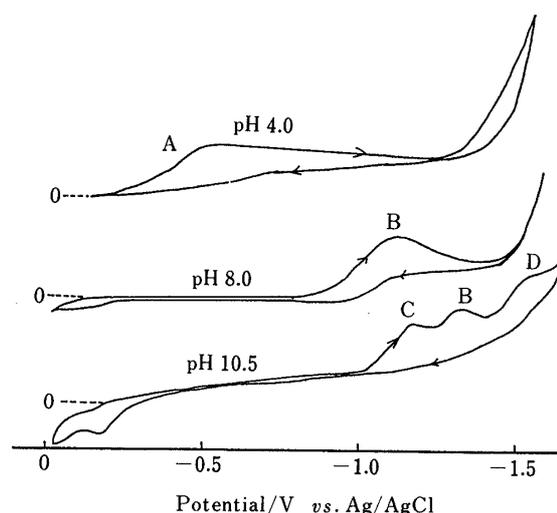


Fig. 5 Cyclic voltammograms of DKG in various pH solutions

Concentration of DKG: 5 mM

元に非活性の DKG が多く存在することによって考えられる. 一方, pH の高いアルカリ性域において顕著に限界電流値が小さくなるのは, DKG のエノール化を始めとする異性化物の生成あるいはカルボキシル基の脱炭酸による分解などによって考えられる. このことは, DKG 溶液の pH が高くなるほど酸化波が増大することにより, 異性化物の生成量の増大が支持される.

DKG のカルボニル基の水和と還元波との関係を明らかにするために, 各種 pH の緩衝液中で得られる還元波 A, B, C について, サイクリックボルタンメトリー及び水銀流出速度と限界電流値との関係を調べた. Fig.

5にDKGの各種緩衝液中でのサイクリックボルタモグラムの示す。還元波A, B, Cに相当する還元ピークが明らかに認められるにもかかわらず、これらの還元波に対応する酸化波はいずれも認められず、これらの還元波は非可逆の性質を有することが分かる。又、直流ポーログラフィーでの結果と同様に、DKGからの異性化物のものと考えられる酸化ピークが認められる。これはDKGがエノール化を行い再びエンジオール構造を形成し、更に再びラクトン環を形成したものの、あるいはその反応の中間体であると考えられる。この酸化ピークを示すものもアスコルビン酸と同様に、対応する還元ピークを示さない非可逆の酸化ピークであることが分かった¹⁴⁾。pH 10.5においては還元波A, B, C以外に還元波Dが認められるがこのものはDKGの異性化物によるものと考えられるが更に検討が必要である。又、水銀流出速度に対する影響については、水銀だめの高さを変えると、DHAの限界電流値は高さに比例することより完全な反応電流の性質を示すのに対して、DKGから得られるA, B, Cいずれの還元波も反応電流を含む拡散電流の性質を示した⁷⁾。

このことは、DHAの場合と同様に、DKGのカルボニル基の電極還元にも水和が関与していることを示唆するが、DHAの場合は、3位のカルボニル基は水溶液中において脱水反応によりヘミケタール環を有するためにDKGの場合よりもより反応電流の性質を示していると考えられる¹³⁾。

3・2 紫外吸収スペクトル

Fig. 6にDKGを無酸素中性及びアルカリ性溶液中に放置したときの紫外吸収スペクトルの経時変化を示す。DKGの水溶液は酸性では水和により紫外領域に特異的な吸収を示さないが中性及びアルカリ性溶液中では265 nm及び345 nmに吸収極大を示し、両者は時間の経過とともに増加している。この265 nm及び345 nmの吸収はそれぞれDKGから生成する3,4-及び2,3-エンジオール型のジケトグルコノ- δ -ラクトン（それぞれ3,4-, 2,3-End.DKGLと略記）の化合物の生成によるものである⁹⁾¹⁰⁾。中性溶液中では、3,4-End.DKGLのみが生成され、アルカリ性溶液中では反応初期から3,4-End.DKGLの生成が認められるが、時間の経過につれてその増加の程度は減少し、しだいに2,3-End.DKGLの生成が増加する。このことより、DKGからの2,3-End.DKGLの生成には3,4-End.DKGLの生成が関与していることを示すと考えられる。なお、DKG溶解1時間後のアルカリ性溶液中での3,4型と2,3型の生成比は

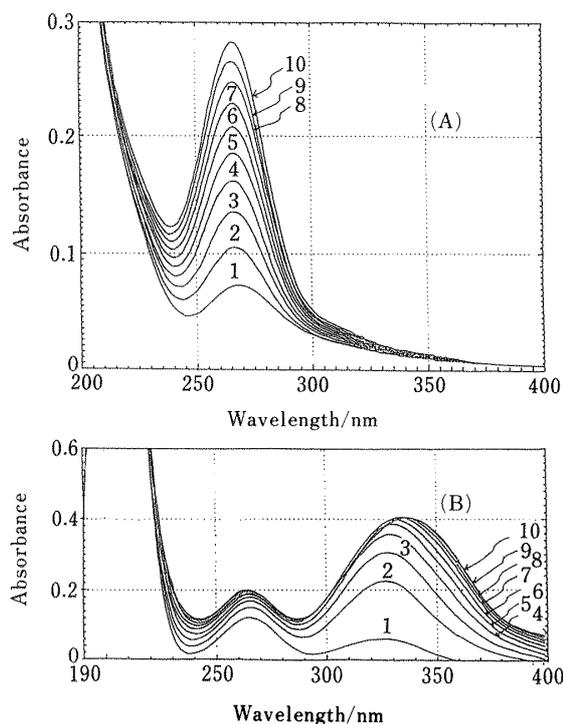


Fig. 6 Time course of UV spectra of isomerized products formed from DKG (1 mM) under deoxygenated conditions in a neutral buffer solution (A) or in an alkaline buffer solution (pH 10.0) (B) at 25°C

The spectra were measured after incubation — 1: 10 min, 2: 20 min, 3: 30 min, 4: 40 min, 5: 50 min, 6: 60 min, 7: 70 min, 8: 80 min, 9: 90 min, 10: 100 min.

両者が同じ吸光係数を示すと仮定した場合約1:2となった。ところで、3,4-End.DKGLが生成されるためには、3,4位でエノール化することが必要であり、このためにDKGの3位のカルボニル基が非水和の形で存在していることが必要であるが、その2位については水和、非水和は特に問題とならないと考えられる。アルカリ性溶液中で2,3-End.DKGLが多く生成されるためにはDKGはその生成過程においてそのカルボニル基は2,3位とも非水和の状態が存在しなければならず、これらのことより水和の問題について考慮するとそのpHにより、DKGのジカルボニル基のすべてが水和したものほかに、2位のみが水和したもの、すべてが非水和のもの、そのカルボニル基の水和の状態の違いにより少なくとも3種類を考える必要がある。

3・3 DKGの水溶液中での存在状態

DKGの酸性、中性、アルカリ性溶液中での水和と

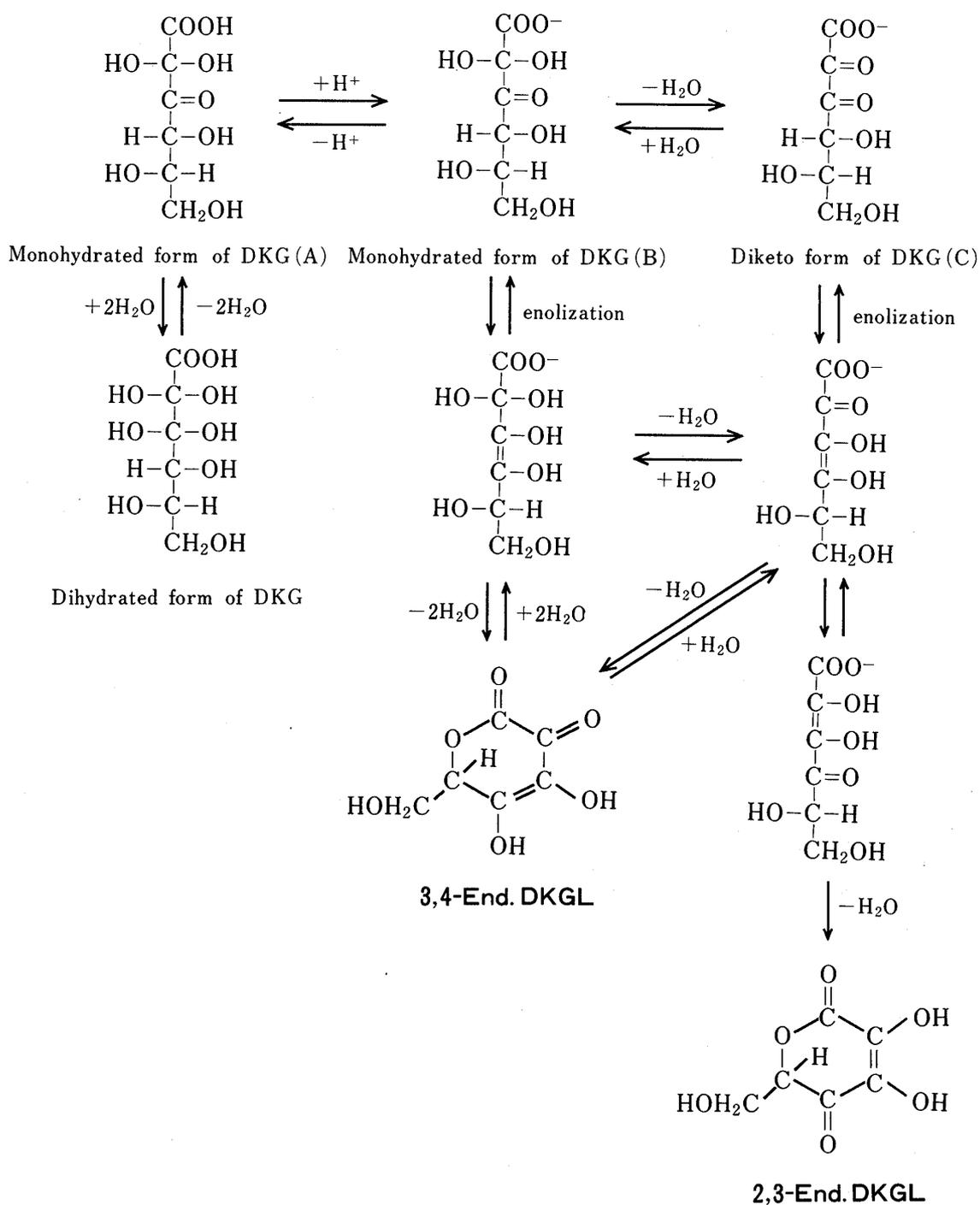


Fig. 7 Hydration of DKG and subsequent formation of 2,3- and 3,4-endiol forms of 2,3-diketo-L-gulono- δ -lactone in aqueous solution

3,4-End. DKGL 及び 2,3-End. DKGL の生成との関連性について以上の結果をまとめて Fig. 7 に示す. 酸性溶液中では水素イオン濃度が高いこと, 更に 3,4 型, 2,3 型の End. DKGL が見られないことより 2 位が水和され, カルボキシル基が非解離の DKG の状態でその 3

位のカルボニル基の電極還元反応によるものが還元波 A である. 中性溶液中での直流ポーラログラフィーで還元波 B が見られる pH では, 3,4-End. DKGL の生成が認められることを考えると, このことより, 3,4-End. DKGL がラクトン化する前の構造である 3,4 位で

エンジオール構造をもつ DKG の存在が必要であり、このことは 3 位が水和していないこと、カルボキシル基が解離しているものの存在が必要である。つまり、2 位が水和し、更にカルボニル基が解離した DKG の 3 位のカルボニル基の電極還元反応によるものが還元波 B であると考えられる。更に、アルカリ性の溶液では水素イオン濃度が低くなり、3,4-End.DKGL だけでなく、2,3-End.DKGL の生成も認められることより、エノール化により 3,4 位でエンジオール構造をもつ DKG の生成の他に 2,3 位でエンジオール構造をもつ DKG の存在が必要である。このことは、2 位のカルボニル基が非水和であることが必要であり、つまりこのことはカルボニル基が解離したもので 3 位のカルボニル基のみならず 2 位のカルボニル基も水和されていない DKG の存在が必要となる。つまり、酸解離型で非水和型の状態のもの 2 位のカルボニル基の電極還元されたものが還元波 C と考えられる。

以上のことは、DKG の分子種の平衡関係においては、カルボニル基の解離状態及びカルボニル基の水和が大きく関与しており、その酸解離により DKG が不安定になり、その後、pH が大きくなるとカルボニル基の水和の状態が変化し二つの還元波を示し、そのものがそれぞれエノール化及び δ ラクトン化することにより、2 種類の異性化合物を生成する。更に、DKG の水和型の還元波は DHA のように典型的な反応電流の性質を示さないのは、DKG が DHA のようにヘミケタール環を形成しないためであると考えられる。

終わりに、本研究を行うにあたり溶液論的な立場からご教示いただいた大阪府立大学松本幸雄教授に深く感謝いたします。

(1992 年 4 月, 1992 年度日本農芸化学会)
大会において一部発表

文 献

- 1) 村田 晃: 農化, **64**, 1843 (1990).
- 2) 荒川信彦: 栄養と食糧, **43**, 157 (1990).
- 3) K. Nishimura, M. Ohtsuru, K. Nigota: *J. Agric. Food Chem.*, **37**, 1539 (1989).
- 4) 倉田忠男: 農化, **64**, 1846 (1990).
- 5) M. Takagi, H. Higashioka, K. Tamura, N. Morita: *Agric. Biol. Chem. (Tokyo)*, **50**, 41 (1986).
- 6) T. Kurata, Y. Sakurai: *Agric. Biol. Chem. (Tokyo)*, **31**, 170 (1967).
- 7) S. Ono, M. Takagi, T. Wasa: *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **31**, 356 (1958).
- 8) K. Pfeilsticker, F. Marx, M. Bockisch: *Carbohydr. Res.*, **45**, 269 (1975).
- 9) M. Otsuka, T. Kurata, N. Arakawa: *Agric. Biol. Chem. (Tokyo)*, **50**, 531 (1986).
- 10) H. Tanaka, E. Kimoto: *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **63**, 2569 (1990).
- 11) Y. Kagawa: *J. Biochem. (Tokyo)*, **51**, 134 (1962).
- 12) 梶田武俊, 山本喜男, 千田 貢: 分析化学, **22**, 1051 (1973).
- 13) M. Ohmori, M. Takagi: *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **54**, 501 (1981).
- 14) K. Nakata, N. Morita, S. Sawada, M. Takagi: *Anal. Sci.*, **8**, 51 (1992).



D.c. polarographic reduction wave of 2,3-diketo-L-gulonic acid of carbonyl groups in aqueous solution. Kunihiro NAKATA, Kenji ODA, Naofumi MORITA* Shigeo SAWADA** and Masanosuke TAKAGI*** (*Department of Agricultural Chemistry, College of Agriculture, University of Osaka Prefecture, 1-1, Gakuen-cho, Sakai-shi, Osaka 593; **Department of Chemistry, Faculty of Science and Technology, Kinki University, 3-4-1, Kowakae, Higashi-Osaka-shi, Osaka 577; ***Department of Bioengineering, Faculty of Engineering, Kansai University, 3-3, Yamate-cho, Suita-shi, Osaka 577)

Polarographic reduction wave and hydration of carbonyl groups of 2,3-diketo-L-gulonic acid (DKG) were studied in various pH solutions by d.c. polarography, cyclic voltammetry and spectrophotometry. Three kinds of polarographic reduction waves A [half wave potential ($E_{1/2}$) = -0.67 V vs. SCE], A and B ($E_{1/2}$ = -1.11 V) and B and C ($E_{1/2}$ = -1.02 V) obtained in acid, neutral and alkaline solutions, respectively, were observed due to the carbonyl groups of DKG. Same kind of reduction waves were also observed in various pH solutions using cyclic voltammogram, but no corresponding oxidation waves were seen, indicating the reaction to be irreversible. Formation of 3,4- and 2,3-endiol forms of 2,3-diketo-L-gulono- δ -lactone (3,4- or 2,3-End.DKGL, respectively) from DKG via isomerization and cyclization was tested spectrophotometrically. In neutral solution, only 3,4-End.DKGL was observed, while both the 3,4- and 2,3-forms were

observed in alkaline solution (pH 10.8). Based on these results, the carbonyl groups of DKG are found to have at least three different hydration forms which could be fully hydrated in acidic pH range, mono-hydrated at the C-3 position in neutral pH range, and not hydrated in alkaline pH range. The pathway for the formation of 3,4- and 2,3-End.DKGL from DKG was proposed.

(Received October 5, 1992)

Keyword phrases

d.c. polarography and cyclic voltammetry of 2,3-diketo-L-gulonic acid (DKG); reduction waves of DKG in aqueous solution.
