

抗坏血酸在注射液中的降解途径*

何平 殷恭宽

(华西医科大学药理学系, 成都)

提要 研究了中性抗坏血酸注射液在无氧条件下的降解产物和降解反应。检测出的降解产物有: 2-酮-L-古洛糖酸、二氧化碳和木糖, 分离、鉴定了新的降解产物——丙酮醛, 并研究了抗坏血酸的水解与 2-酮-L-古洛糖酸脱羧的反应动力学, 提出了中性抗坏血酸注射液在无氧条件下可能的降解途径。

关键词 抗坏血酸; 无氧降解; 2-酮-L-古洛糖酸; 丙酮醛

抗坏血酸在水溶液中的降解反应分为有氧氧化和无氧降解。在有氧条件下, 抗坏血酸首先被氧化为去氢抗坏血酸, 后者水解开环生成 2, 3-二酮-L-古洛糖酸, 再继续降解成为其它产物^(1,2)。在酸性、无氧条件下, 已证明抗坏血酸的主要降解产物是糠醛和二氧化碳^(3,4)。关于糠醛生成途径, 也有人进行过推测^(5,6)。在中性条件下, 抗坏血酸的无氧降解反应尚未见报道。为此, 本文作者研究了国内生产的抗坏血酸注射液 (pH 6.4~6.6) 的降解产物和抗坏血酸与其降解产物的反应动力学, 确定了抗坏血酸的一些降解产物, 并提出了抗坏血酸在该条件下可能的降解途径。

实 验 部 分

一. 药品和仪器

25%, 5% 抗坏血酸注射液 (pH 6.4~6.6) 处方及工艺见文献⁽⁷⁾。用于测 CO₂ 的抗坏血酸样品除采用 NaOH 调节 pH 外, 处方及工艺均同上。2-酮-L-古洛糖酸溶液的配制: 取一定量 2-酮-L-古洛糖酸 (西南制药二厂提供, 并用乙醇重结晶, mp 164~166°C), 用适量新沸冷却的去离子水溶解, 加入与抗坏血酸注射液相同的稳定剂, 用 NaHCO₃ 调 pH 至 6.4~6.6 (若测 CO₂, 则用 NaOH 调 pH), 在氮气流下灌封安瓿。薄层层析用硅胶 G (10~40 μm), 由青岛海洋化工厂生产。

红外光谱、紫外光谱、质谱和核磁共振谱分别用下列仪器测定: Nicolet MX-1 红外光谱仪, UV-240 分光光度计, ZAB-2 F 质谱仪, FX-90 θ 核磁共振仪。

二. 薄层层析条件

系统 1

展开剂: 正丁醇—醋酸—水 (4:1:5)。

显色剂: I. 0.1 N AgNO₃—2 N NH₄OH—2 N NaOH (1:1:2);

II. KMnO₄ 5 g, Na₂CO₃ 1 g, 水 100 ml。

本文于 1985 年 4 月 3 日收到。

* 中国科学院科学基金资助课题

临用前将 I 和 II 等量混合。

系统 2

展开剂：正丁醇—丙酮—0.1 M H_3PO_4 —0.1 M Na_2HPO_4 (4:5:0.5:0.5)。

显色剂：0.1 N $NaIO_4$ 和联苯胺相继显色。

三. 抗坏血酸降解产物的 2,4-二硝基苯脲衍生物的制备与分离

取经沸水浴加热降解 10 h 的 25% 抗坏血酸注射液安瓿或含 5% 2-酮-L-古洛糖酸溶液的安瓿 100 支，取出溶液(各约 200 ml)，加入 2,4-二硝基苯脲试剂，在 30 min 内收集沉淀。将此沉淀用乙酸乙酯溶解，分别用 2 N HCl 和水洗涤，并用无水 Na_2SO_4 脱水，减压浓缩至较小体积，拌合少量硅胶，用柱层析分离，用苯—乙酸乙酯(3:1→1:1)作梯度洗脱，分段收集，减压浓缩，将所得纯品进行结构鉴定。

四. 含量测定

抗坏血酸浓度用碘量法测定。

2-酮-L-古洛糖酸浓度测定参照 Hryeh⁽⁸⁾ 的报道，方法如下：

于磨口带塞试管中取 2-酮-L-古洛糖酸溶液 (30~120 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 5.0 ml，加入邻苯二胺试剂 (0.04% 邻苯二胺溶液，用 10% 醋酸配制) 5.0 ml，摇匀，置于沸水浴中加热 40 min，取出并迅速冷却，30 min 内在 340 nm 处测吸收度，同时作空白校正。在该条件下，浓度与吸收度之间为线性关系[浓度($\mu\text{g}/\text{ml}$) = $-0.785 + 210.5 \times$ 吸收度]，标准直线的相关系数 $r = 0.9997$ ，变异系数平均值为 3%。

抗坏血酸注射液中 2-酮-L-古洛糖酸浓度测定与上有所不同，由于大量的抗坏血酸存在对测定有干扰，必须采用薄层分离后定量。层析条件选用系统 1，硅胶 G 板。

量取待测液 (含 2-酮-L-古洛糖酸 0.2~0.8%) 50 μl 于层析板一侧点成一线，另一侧点适量标准溶液作显色定位用，展开后，挥干展开剂，用一洁净玻板盖住样品，喷显色剂定位，参照定位斑点刮取硅胶置离心管中，加水 3.0 ml，充分搅拌，于 3000 r/min 离心 10 min，取上清液 2.0 ml，加邻苯二胺试剂 2.0 ml，置沸水浴中加热 40 min，冷却，于 340 nm 处测吸收度，同时作空白，浓度与吸收度之间为线性关系(百分浓度 = $-0.069 + 1.887 \times$ 吸收度)，标准直线的相关系数 $r = 0.9996$ ，变异系数平均值为 6.6%，平均回收率为 67%。

安瓿中二氧化碳浓度测定采用山本隆一报道的方法⁽⁹⁾。

结果和讨论

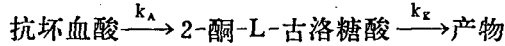
一. 抗坏血酸在中性无氧条件下的降解产物

在充氮安瓿中，抗坏血酸以及 2-酮-L-古洛糖酸的降解均可认为是无氧降解。用薄层层析检测在沸水浴中降解 10 h 的 25% 抗坏血酸注射液，用系统 1 展开、显色后出现三个斑点， R_f 值分别是 0.60(抗坏血酸)、0.10(2-酮-L-古洛糖酸)和 0.21(未确定)；用系统 2 展开、显色后出现三个斑点， R_f 值分别为 0.58(抗坏血酸)、0.11(2-酮-L-古洛糖酸)和 0.36(木糖)。未检出去氢抗坏血酸和糠醛。结果表明，在该条件下，抗坏血酸降解后，可生成 2-酮-L-古洛糖酸和木糖，这与有氧氧化或酸性无氧降解不同，不生成去氢抗坏血酸和糠醛。据上述结果，可初步推测，抗坏血酸在中性无氧条件下降解首先是水解，生成 2-酮-L-古洛糖酸。该

反应的逆反应很难进行, 在 2-酮-L-古洛糖酸降解液中未检测出抗坏血酸。

二. 抗坏血酸的水解反应

抗坏血酸在该条件下的降解是否首先发生水解反应生成 2-酮-L-古洛糖酸, 可用连续反应的动力学规律进行验证。



25% 抗坏血酸注射液的无氧降解, 在反应初期, 浓度或浓度的对数与时间均呈线性关系。为处理数据方便, 按假一级反应处理, 2-酮-L-古洛糖酸在该条件下的无氧降解为假一级反应, 根据连续一级反应速率方程:

$$C_A = C_{A_0} \cdot e^{-k_A \cdot t} \quad (1)$$

$$C_K = \frac{C_{A_0} \cdot k_A}{k_K - k_A} (e^{-k_A \cdot t} - e^{-k_K \cdot t}) \quad (2)$$

式中 C_{A_0} , C_A 和 C_K 分别表示抗坏血酸初始浓度、反应至 t 时的抗坏血酸浓度和 2-酮-L-古洛糖酸浓度, k_A 和 k_K 分别表示抗坏血酸和 2-酮-L-古洛糖酸的假一级反应速率常数。测得沸水条件下 (98°C), 25% 抗坏血酸注射液 ($C_{A_0} = 1.419 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) 的降解速率常数 $k_A = 0.015 \text{ h}^{-1}$, 1% 2-酮-L-古洛糖酸溶液的降解速率常数 $k_K = 0.044 \text{ h}^{-1}$, 将此数据代入式 (1) 和式 (2), 算出反应至 t 时的 C_A 和 C_K , 与实测值比较, 结果如图 1 所示。为了进行对比, 也计算了 5% 抗坏血酸注射液 ($C_{A_0} = 0.2953 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, $k_A = 0.0110 \text{ h}^{-1}$) 降解过程中抗坏血酸浓度和生成的 2-酮-L-古洛糖酸浓度, 与实测值比较, 结果如图 2 所示, 计算值和实测值均较符

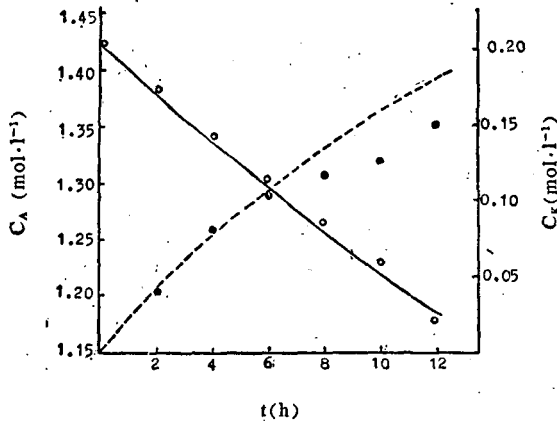


Fig 1. Formation of 2-keto-L-gulonic acid from anaerobic degradation of 25% ascorbic acid injection (98°C , pH 6.5). Calculated concentration of ascorbic acid (—); 2-keto-L-gulonic acid (---). Determined concentration of ascorbic acid (\circ); 2-keto-L-gulonic acid (\bullet)

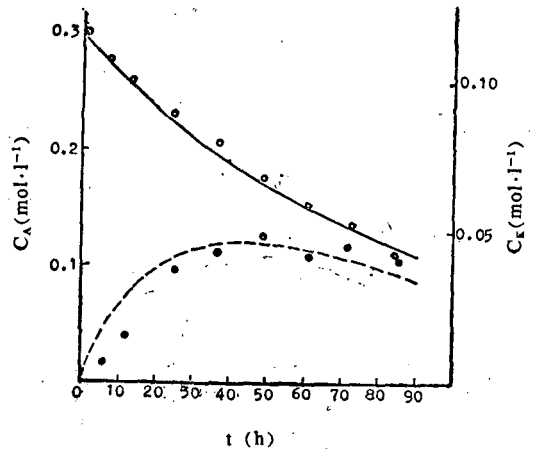


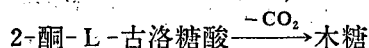
Fig 2. Formation of 2-keto-L-gulonic acid from anaerobic degradation of 5% ascorbic acid injection (98°C , pH 6.5). Calculated concentration of ascorbic acid (—); 2-keto-L-gulonic acid (---). Determined concentration of ascorbic acid (\circ); 2-keto-L-gulonic acid (\bullet)

合。因此可以认为: 在中性、无氧条件下, 抗坏血酸第一步降解反应主要是水解反应, 经由 2-酮-L-古洛糖酸进行。至于生成的 2-酮-L-古洛糖酸的浓度变化实测值与计算值有部分偏差, 这是因为: (1) 2-酮-L-古洛糖酸的薄层定量方法操作较繁, 有一定误差; (2) 可能同时存

在其它方式的降解。但是, 经由 2-酮-L-古洛糖酸是该条件下抗坏血酸降解的主要途径。

三. 2-酮-L-古洛糖酸的脱羧反应

抗坏血酸是己烯酸的内酯, 从结构上分析, 抗坏血酸降解的第一步不可能是脱 CO_2 , 脱羧反应必须在内酯水解开环后才可能进行。2-酮-L-古洛糖酸的降解反应有脱羧和脱水两种可能。表 1 是 2-酮-L-古洛糖酸在中性、无氧条件下降解时生成 CO_2 量的测量结果, 从分解 1 mol 2-酮-L-古洛糖酸生成 1 mol CO_2 表明, 在该条件下, 2-酮-L-古洛糖酸的降解反应主要是脱羧反应, 即



用薄层层析或颜色反应⁽¹⁰⁾可证实有木糖生成。本文还测定了 25% 抗坏血酸注射液在该条件下降解时生成的 CO_2 量, 分解 1 mol 抗坏血酸, 生成 0.76 mol CO_2 , 该值不随反应时间而变。

Tab 1. Formation of carbon dioxide from anaerobic degradation of 5% 2-keto-L-gulonic acid solution (98°C, pH 6.5)

Time (h)	2-Keto-L-gulonic acid (mol)		CO_2 (mol)	Moles of CO_2 per mole of 2-keto- L-gulonic acid decomposed	
	C_t	$\Delta C_t = C_{t_0} - C_t$		$C_{\text{CO}_2}/\Delta C_t$	Average
0	0.2689				
2	0.2313	0.0376	0.0363	0.97	
4	0.1863	0.0826	0.0830	1.00	
6	0.1584	0.1105	0.1109	1.00	
8	0.1299	0.1390	0.1355	0.97	
10	0.1031	0.1658	0.1477	0.89	0.97
12	0.0902	0.1777	0.1683	0.95	
14	0.0806	0.1883	0.1820	0.97	
16	0.0715	0.1974	0.1941	0.98	
18	0.0602	0.2087	0.2033	0.97	

四. 新的抗坏血酸降解产物——丙酮醛的鉴定

为探讨在中性、无氧条件下抗坏血酸的降解反应, 本文用 2,4-二硝基苯腙的方法, 进一步研究了抗坏血酸的降解产物。由于抗坏血酸降解可生成含羰基的化合物, 将此类化合物制成 2,4-二硝基苯腙后, 容易提取和分离。25% 抗坏血酸注射液降解产物的 2,4-二硝基苯腙用层析法分离有六个主要斑点, 其中第一个斑点经结构鉴定为丙酮醛 2,4-二硝基苯腙, mp 290~292°C。元素分析 $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_8\text{N}_8$; 计算值(%), C 41.66, H 2.77, N 25.92; 实测值(%), C 42.40, H 2.65, N 25.21。红外光谱 $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}} \text{cm}^{-1}$, 3274, 3094, 1613, 1592, 1582, 1503, 1338, 1315, 1143, 1088, 1060, 835, 744。紫外光谱 $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOAc}} \text{nm}$, 430, 395, 251。质谱 m/z , 432(M^+ , 15), 417(3), 249(15), 183(55), 164(40), 137(15), 91(45), 63(100)。

核磁共振谱 (90 兆周, 吡啶- d_5), δ 2.41 (S, $-\text{N}=\text{C}-\text{CH}_3$)。与丙酮醛标准品 (上海试剂一厂) 的 2,4-二硝基苯腙对照, 其薄层层析、红外光谱及紫外光谱均一致。上述结果表明, 抗坏血酸在中性注射液中无氧降解后, 有丙酮醛生成。

在 2-酮-L-古洛糖酸中性、无氧降解液中，用同样方法也分离到丙酮醛 2, 4-二硝基苯脞。mp 289~291°C。元素分析实测值(%), C 41.43, H 2.66, N 25.81。薄层层析的 Rf 值、红外光谱和紫外光谱均与丙酮醛 2, 4-二硝基苯脞标准品一致。

对于分离、提纯的其它几个 2, 4-二硝基苯脞衍生物，除有 2-酮-L-古洛糖酸等已知化合物的 2, 4-二硝基苯脞外，由于不易得到满意的质谱和核磁共振谱，仍有数个化合物尚未鉴定结构。

五. 中性条件下抗坏血酸无氧降解生成丙酮醛的可能途径

抗坏血酸在注射液中的无氧降解不生成糠醛，降解反应不是按糠醛生成途径进行。前已证实，在该条件下，抗坏血酸首先水解生成 2-酮-L-古洛糖酸，后者脱羧生成木糖，至于木糖以后的降解，推测是经脱水、再分解生成丙酮醛。整个过程如图 3 所示。

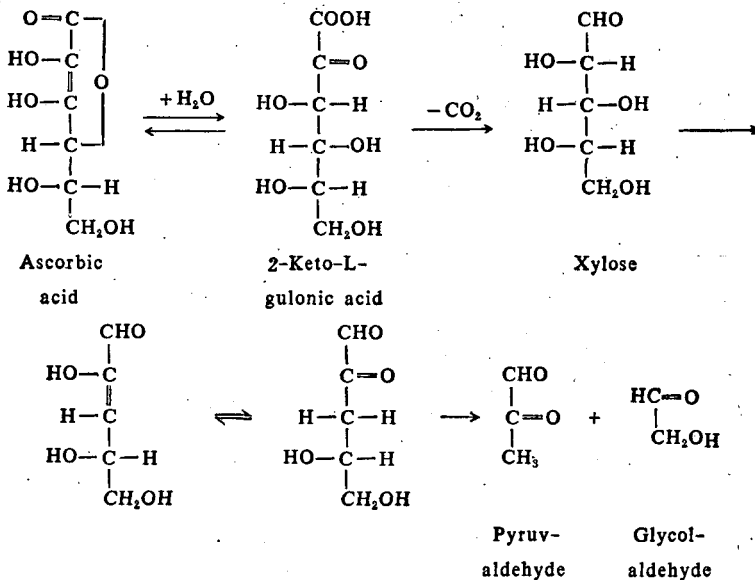


Fig 3. Proposed pathway for the anaerobic degradation of ascorbic acid in neutral injection(pH 6.5)

致谢 中国医科院药物研究所侯双洲、彭佑恩等同志协助测定氢谱及质谱；中国科学院成都分院有机所陈世矩等同志代测红外光谱；四川大学化学系邓应翔协助测定元素分析。

参 考 文 献

1. 神谷真太郎. L-アスコルビン酸の分解に関する研究. L-アスコルビン酸の褐変分解. 農化 1959, 33: 398, 402; 1960, 34: 8, 13.
2. 大谷省治. 薬剤の変色防止に関する研究(第6報)アスコルビン酸水溶液の変色(4). 薬剤学 1964, 24: 293.
3. 大谷省治. 薬剤の変色防止に関する研究(第3報)アスコルビン酸水溶液の変色. 薬剤学 1962, 22: 150.
4. Finholt P, et al. Rate studies on the anaerobic degradation of ascorbic acid II, III. *J Pharm Sci* 1965, 54: 124, 181.
5. Cier A, et al. Degradation of ascorbic acid in inert atmosphere. *Bull Soc Chim Fr* 1959, 74.
6. Kurata T and Sakurai Y. Degradation of L-ascorbic acid and mechanism of nonenzymic browning reaction Part II. Non-oxidative degradation of L-ascorbic acid including the formation of 3-deoxy-L-pentosone. *Agr Biol Chem* 1967, 31: 170.
7. 马宝忠等. 25%抗坏血酸注射液稳定性研究 I. 25%抗坏血酸注射液处方筛选. 四川医学院学报 1979, 10: 1.
8. Нгуен ТТХ. Спектрофотометрический метод определения 2-кето-Л-гулоновой кислоты. *Прцкл Бюхим Микробиол* 1977, 13: 465.

9. 山本隆一、山本恵津子. アスコルビン酸水溶液の嫌気分解 (I) 炭酸ガスの生成量につて. 薬剂学 1964; 24:309.
10. Tokuya Harada. New color reaction of sugars with ethyl malonate. *Biochim Biophys Acta* 1962; 63: 334.

THE PATHWAY FOR THE ANAEROBIC DEGRADATION OF ASCORBIC ACID IN NEUTRAL INJECTION

HE Ping and YIN Gong-Kuan

(Faculty of Pharmacy, West China University of Medical Sciences, Chengdu)

ABSTRACT The anaerobic degradation of ascorbic acid in neutral injection has been studied. Some degradation products as 2-keto-L-gulonic acid and xylose were identified by using of TLC. A new degradation product pyruvaldehyde was isolated and identified as 2,4-dinitrophenylhydrazone. The amount, of 2-keto-L-gulonic acid formed from degradation of ascorbic acid in injection and amount of carbon dioxide produced from that of ascorbic acid and 2-keto-L-gulonic acid were determined. From these, the pathway for the anaerobic degradation of ascorbic acid in neutral injection was proposed.

Key words Ascorbic acid; Anaerobic degradation; Degradation pathway; 2-keto-L-gulonic acid; Pyruvaldehyde