

衛生化学
EISEI KAGAKU
29 (6) 368-375 (1983)

グリシンに対する次亜塩素酸の作用 (第2報)¹⁾ クロルグリシンの生成とその分解機構

櫻井映子, 澤村良二
日本大学理工学部薬学科

The Reaction of Hypochlorite with Glycine. II. The Mechanisms of the Formation of Chloroglycines and Their Decomposition

EIKO SAKURAI and RYOJI SAWAMURA

Department of Pharmacy, College of Science and Technology, Nihon University
1-8, Kandasurugadai, Chiyoda-ku, Tokyo 101, Japan

(Received May 17, 1983)

The mechanism of reaction of glycine with hypochlorite was investigated under neutral conditions in phosphate buffer. At the first stage in this reaction, monochloroglycine was formed at any molar ratio of glycine and hypochlorite. When the amount of hypochlorite exceeded the equimolar of glycine, dichloroglycine was formed from monochloroglycine. Although monochloroglycine was fairly stable, dichloroglycine was labile, so that it underwent decarboxylation and dehydrochlorination to form cyanide, as the corresponding nitrile. Cyanide thus formed was chlorinated rapidly by combined residual chlorine in chloroglycine molecules or by excess hypochlorite, and converted to cyanogen chloride. One mole glycine needed three moles of hypochlorite for the formation of the equivalent cyanogen chloride. Cyanogen chloride was decreased by the subsequent addition of excess hypochlorite.

Total chlorine consumed by 1 mol glycine was 4.5 mol.

Keywords—amino acid; chloramine; chlorination; cyanide; cyanogen chloride; glycine; hypochlorite; *N*-chloromethyleneimine; *N*-dichloroglycine; *N*-monochloroglycine

まえがき

グリシン²⁻⁴⁾及びペプチドの N 末端グリシン⁵⁾に活性塩素を作用させたときにシアン化水素及びクロルシアンを生成することが報告されている。著者らは前報¹⁾で中性下低濃度におけるグリシンと次亜塩素酸の反応モル比と生成物量の関係を検討し、グリシン-クロラミンが分解してシアン化水素を生じ、このシアン化水素はグリシン-クロラミンまたは遊離次亜塩素酸によって塩素化されてクロルシアンとなることを報告した。本報では、この反応中間体の生成分解を含めて反応機構を検討して報告する。

実験方法

1. グリシンと次亜塩素酸の反応 前報¹⁾と同様に 1/75 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) 中で、グリシン 0.15, 0.2, 5×10^{-4} M (約 1—37 mg/l) に次亜塩素酸約 0.3—

40×10^{-4} M (約 2—280 mg/l) を約 20°C で作用させた。これを試料として DPD 法による残留塩素の定量と、紫外外部吸収、生成シアン、生成クロルシアン、生成アンモニアを測定した。

2. メチルアミンと次亜塩素酸の反応 1/75 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) 中でメチルアミン 5×10^{-4} M (15.53 mg/l) に次亜塩素酸 $2.5—40 \times 10^{-4}$ M (17.73—283.68 mg/l) を約 20°C で 15—60 分間作用させた。これを試料として DPD 法による残留塩素の定量と、生成シアン、生成クロルシアン、生成アンモニアを測定した。

3. *N*-クロルメチレンイミンと次亜塩素酸の反応 1/75 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) 中で、活性塩素として 7.01×10^{-4} M の *N*-クロルメチレンイミンに 1.44×10^{-4} M または 14.4×10^{-4} M の次亜塩素酸を約 20°C で作用させた。これを試料としてヨウ素法による総残留塩素の定量

と、生成シアン、生成クロシアンを測定した。

N-クロルメチレンイミン溶液の調製⁶⁾：1.38 g の塩化アンモニウムを少量の水でとかし、0°C 以下で 0.25 M の次亜塩素酸ナトリウム溶液 12 ml を静かに加え、これに 37%ホルマリン 2 ml を加えた。この溶液を冷蔵庫中に保存すると、白色の針状結晶が析出する。結晶は吸湿性が高く、空気中で速かに分解が始まるので、実験の直前に結晶を濾取して直ちに精製水で溶解し、ヨウ素法で有効塩素量を標定して所要濃度に希釈した。

4. DPD法による塩素の定量⁷⁾ 遊離塩素の定量：前報¹⁾と同じ方法で DPD 溶液及び緩衝液 5 ml ずつを混和し、これに試料 100 ml を加えて直ちに硫酸第一鉄アンモニウム溶液 (FAS) で赤色が消えるまで滴定する。

モノクロラミンの定量：遊離塩素定量後の試料中に 0.05%ヨウ化カリウム 1 ml を加え、直ちに FAS で赤色が消えるまで滴定する。

ジクロラミンの定量：モノクロラミン定量後の試料中に、さらにヨウ化カリウム 1 g を加えて溶解し、約 2 分間放置後 FAS で赤色が消えるまで滴定する。

5. クロラミンによる DPD の発色速度の測定

1/75 M リン酸緩衝液 (pH 7) 中で $1.5\text{--}6 \times 10^{-5}$ M のグリシン又は塩化アンモニウム又はメチルアミン溶液に 3×10^{-5} M の次亜塩素酸を約 20°C で 10 分間反応させたものを試料とした。

10 mm の吸光度測定用ガラスセル中で DPD 試薬 0.15 ml と DPD 滴定用リン酸緩衝液 0.15 ml を混和した中に試料を 3 ml 加える。試料を加えると同時にチャートスピード 10 mm/min で記録計を作動させて 550 nm の吸光度の経時変化をみた後、各濃度の KI 溶液 (1 ml 中に KI 0.5—5000 mg 含有) を 0.03 ml 加えて混和し、ひきつづいて吸光度の変化を記録させた。

DPD の発色速度は、記録された各曲線の初期の傾斜から 1 分間の吸光度の増加量を求め、有効塩素濃度 mm で割って、有効塩素 1 mm 当りの初速度 $\Delta OD/\text{分}$ として表わした。

6. その他の測定 イオン電極法によるシアンイオンの定量、酵素法によるアンモニア性窒素の定量、ヘッドスペース法及びピリジンバルビツール酸法によるクロルシアンの定量は、前報¹⁾と同様の操作で行った。

実験結果

1. グリシンクロラミンの DPD 発色速度に対する KI 濃度の影響

グリシンまたはアンモニアに対して次亜塩素酸を 0.5—2 の種々のモル比で加えたものについて、KI を加え

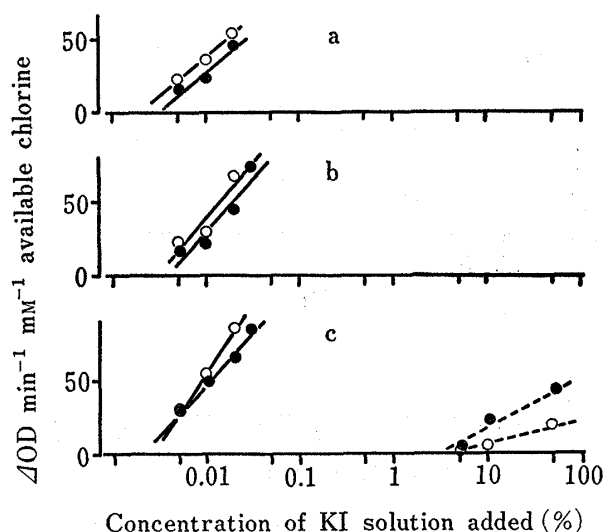


Fig. 1. Effect of KI Dose on the Velocity of DPD-Color Development by Chloramines

In a photometer cell, 0.15 ml each of buffer reagent and DPD indicator reagent is placed, and 3 ml chloramine solution (in 1/75 M phosphate buffer pH 7.0) is added and mixed. To the mixture, 0.03 ml KI solution is added and mixed immediately, and the absorbance at 550 nm is recorded at a chart speed of 10 mm a min. The velocity of absorbance increase is calculated from the incipient increment on the chart and shown in $\Delta OD \text{ min}^{-1} \text{ mm}^{-1}$ available chlorine determined in each fraction.

○ Ammonia chloramine	● Glycine chloramine		
— monochloramine	— monochloramine		
..... dichloramine	 dichloramine		
	a	b	c
Ammonium chloride	$6.0 \times 10^{-5} \text{ M}$	$3.0 \times 10^{-5} \text{ M}$	$1.5 \times 10^{-5} \text{ M}$
Glycine	$6.0 \times 10^{-5} \text{ M}$	$3.0 \times 10^{-5} \text{ M}$	$1.5 \times 10^{-5} \text{ M}$
Hypochlorite	$2.97 \times 10^{-5} \text{ M}$	$2.97 \times 10^{-5} \text{ M}$	$2.97 \times 10^{-5} \text{ M}$

たときに起る DPD 発色の速度を測定したものうち、1:0.5, 1:1, 1:2 の 3 段階のモル比での、発色初速度と KI 溶液の濃度との関係を Fig. 1 に示した。濃度 0.1% 以下の KI 溶液を加えた時の発色はいずれのモル比 (Fig. 1-a, -b, -c) でも認められ、これはモノクロラミンによるもの⁸⁾で、アンモニアとグリシンの間には差がない。

グリシンまたはアンモニアに対して次亜塩素酸を等モル以上加えた溶液に濃度 5% 以上の KI 溶液を加えると、モノクロラミンによる発色が直ちに完了した後、さらに経時的に吸光度の増加が認められた。この経時的な発色増加はモル比 1:2 (Fig. 1) についてのみ認められるので、これはジクロラミンによるものであると考えられる。また、アンモニアとグリシンとを比較すると、呈色に必要な KI 量はグリシンもアンモニアもほぼ同量であるが、発色速度はグリシンの方が速いことがわかった。

これらのことは、グリシンのクロラミンの場合にもア

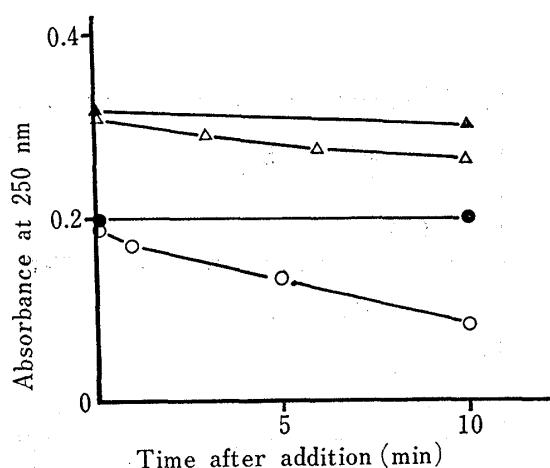


Fig. 2. Decomposition of Chloramines

α -Amino acid	Hypochlorite
▲ alanine	$4.854 \times 10^{-4} \text{M}$
△ serine	$5.660 \times 10^{-4} \text{M}$
● glycine	$5.395 \times 10^{-4} \text{M}$
○ glutamic acid	$5.660 \times 10^{-4} \text{M}$

ンモニアのモノクロラミン、ジクロラミンと同じ条件で DPD 法により測定できるという Palin⁹⁾ の報告と一致している。

2. N-モノクロルグリシンの安定性

N-モノクロルアミノ酸の紫外部吸収は 250 nm 付近にあり,^{5,10,11)} Zgliczynski ら¹¹⁾ は 255 nm の吸光度の経時変化を測定することによって N-モノクロルアミノ酸の分解速度を求めている。そこで、グリシン、アラニン、セリン、グルタミン酸に等モルの次亜塩素酸を加えて、250 nm における吸光度の経時変化を測定し、それぞれの安定性を比較した。その結果は Fig. 2 に示したように、N-モノクロルアラニン、N-モノクロルセリン、N-モノクロルグルタミン酸の吸光度は経時的に減少したが、N-モノクロルグリシンの吸光度は変化しなかった。

また、グリシンに各濃度の次亜塩素酸を加えて 250 nm における吸光度の経時変化を測定した。その結果は Fig. 3 に示すように、モル比 1:1 より過剰のモル比では、生成した N-モノクロルグリシンは経時的に減少することがわかった。

3. グリシン-クロラミンからのクロルシアン生成

Fig. 4 はグリシン $2 \times 10^{-5} \text{M}$ に対して次亜塩素酸をモル比 1:2.9 で反応させ、残留塩素と生成するクロルシアンの量を測定した結果である。反応初期にはジクロラミンの増加が観察され、以後、遊離型、モノ型、ジ型の 3 種の残留塩素が共存して、ともに減少し、塩素消費はほぼ 30 分で完結した。これと対応してクロルシアン生成反応もほぼ 30 分で終了した。

前報¹⁾ ではグリシン $5 \times 10^{-4} \text{M}$ で同様の反応を行った

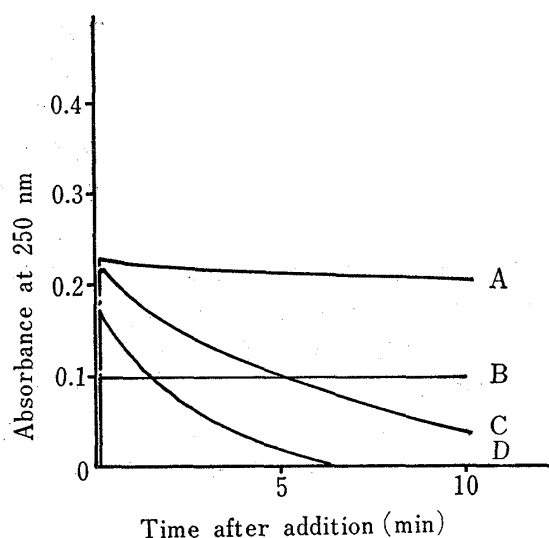


Fig. 3. Decomposition of Glycine-Chloramine

Hypochlorite is added to glycine ($5 \times 10^{-4} \text{M}$) in 1/75 M phosphate buffer (pH 7.0).

Hypochlorite A: $5.475 \times 10^{-4} \text{M}$, B: $2.735 \times 10^{-4} \text{M}$, C: $8.595 \times 10^{-4} \text{M}$, D: $10.945 \times 10^{-4} \text{M}$

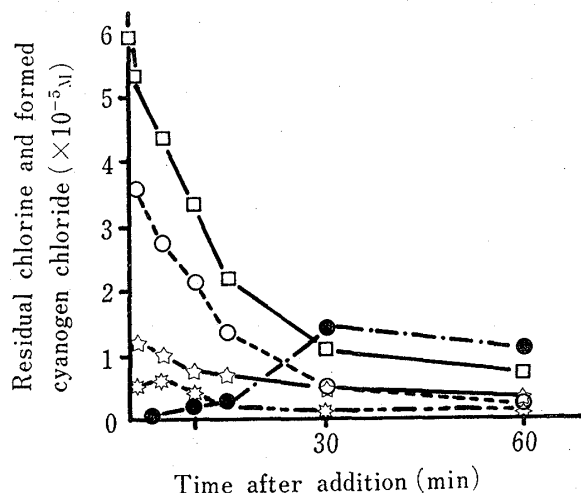


Fig. 4. Residual Chlorine and Formed Cyanogen Chloride in the Mixture of Glycine and Hypochlorite

Hypochlorite ($5.83 \times 10^{-5} \text{M}$) is added to glycine ($2 \times 10^{-5} \text{M}$) in 1/75 M phosphate buffer (pH 7.0). The residual chlorine was determined by the DPD-ferrous titrimetric method for differentiation of chlorine species into free chlorine, mono- and dichloramine. Cyanogen chloride in aqueous phase in the bottle was determined by pyridine-barbiturate method.

□ total residual chlorine; ○ free residual chlorine; ☆ monochloramine; ✱ dichloramine; ● formed cyanogen chloride

場合に遊離塩素が10分以内に消失することを認めたが、Fig. 4 の反応条件では前報¹⁾より反応濃度が薄いために30分後でも遊離塩素が残留していたものと考えられる。

4. グリシンからのシアン生成過程における中間体の検討

N-モノクロルグリシンが脱炭酸反応を起こすと仮定すれば、その生成物として *N*-モノクロルメチルアミンや *N*-クロルメチレンイミンなどを想定することになる。そこで、*N*-モノクロルメチルアミンおよび *N*-クロルメチレンイミンの塩素消費量などについて検討した。

メチルアミンに対して次亜塩素酸を 0.5–2 のモル比で加えたものについて、DPD の発色初速度と KI 溶液の濃度との関係を検討したところ、アンモニアおよびグリシンの場合と同様にメチルアミンに当モル以下の次亜塩素酸を加えたときにはモノクロラミンのみが存在し、モル比 1:1 より過剰の次亜塩素酸を加えるとジクロラミンの生成が認められた。しかし、塩素消費は起らず、モル比 1:2 以上の次亜塩素酸を加えても、遊離塩素、モノクロラミン、ジクロラミンの 3 種類が安定に共存しており、アンモニア、シアン、クロルシアンの生成は全く認められなかった。

N-クロルメチレンイミンについては、*N*-クロルメチレンイミンのみの水溶液では KI を加えなければ DPD の呈色がおこらない。Fig. 5 は *N*-クロルメチレンイミン溶液に各濃度の KI を加えた時の DPD 発色初速度を示したものである。*N*-クロルメチレンイミンでは濃度 0.1 % 以上の KI 溶液を加えることによって発色速度が増加した。Fig. 1 のグリシンおよびアンモニアクロラミンによる DPD の発色に必要な量と比較すると、モノクロラミン < *N*-クロルメチレンイミン < ジクロラミンの順となり *N*-クロルメチレンイミンがモノクロラミンとジクロラミンの中間の性質をもつことがわかった。

N-クロルメチレンイミンに次亜塩素酸を加えた溶液では、加えた DPD との呈色が直ちにおこるが、その後も継続的に呈色が増加する。したがって FAS で赤色が消えるまで滴定しても再び呈色し、正確な終末点を得られず、遊離塩素とクロラミンの分離定量もできない。そこで、*N*-クロルメチレンイミン：次亜塩素酸のモル比を 1:0.2 と 1:2 で反応させ、ヨウ素法により残留塩素を測定した。Fig. 6 はこのときの塩素消費量、シアン及びクロルシアンの生成を示したものである。その結果、1:0.2 では塩素消費の増加とともに、塩素消費量の 1/2 モルに相当するクロルシアンの生成を認めたが、1:2 では塩素消費量が 多くシアンやクロルシアンは検出されなかった。

5. クロルシアン生成量の減少

前報¹⁾において、グリシンに対して 3 倍モルの次亜塩素酸を作用させると理論量のクロルシアンが生成する

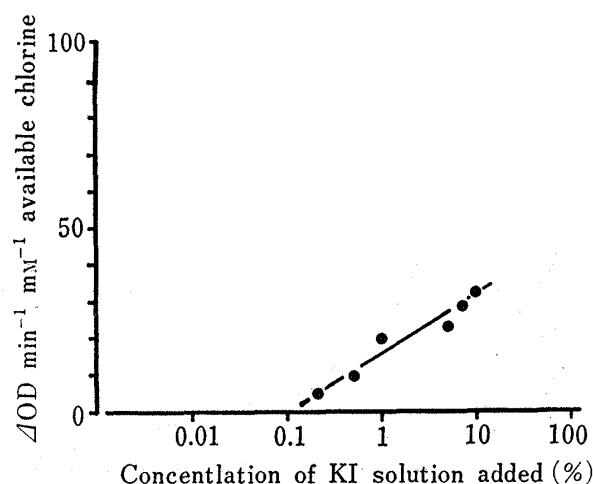


Fig. 5. Effect of KI Dose on the Velocity of DPD-Color Development by *N*-Chloromethyleneimine

The procedure is the same as shown in Fig. 1.

N-chloromethyleneimine: $2.354 \times 10^{-5} \text{ M}$ in 1/75 M phosphate buffer (pH 7.0).

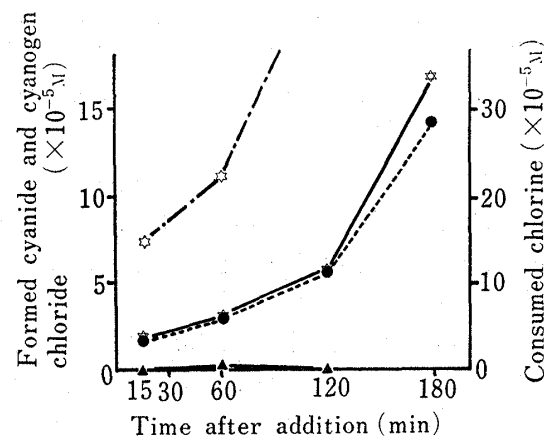


Fig. 6. Consumed Chlorine, Formed Cyanide and Formed Cyanogen Chloride in the Mixture of *N*-Chloromethyleneimine and Hypochlorite

Hypochlorite reacted on *N*-chloromethyleneimine ($70 \times 10^{-5} \text{ M}$) in 1/75 M phosphate buffer (pH 7.0).

Added hypochlorite: $14.38 \times 10^{-5} \text{ M}$

consumed chlorine; ▲ formed cyanide; ● formed cyanogen chloride

Added hypochlorite: $143.78 \times 10^{-5} \text{ M}$

☆ consumed chlorine

No cyanide and cyanogen chloride are observed.

が、3 倍モルより多い次亜塩素酸の作用では逆にクロルシアンの生成量が減少することを報告した。そこで、シアンの水溶液 ($3.846 \times 10^{-4} \text{ M}$) に各濃度の次亜塩素酸を作用させて 30 分後に生成するクロルシアンの量をヘッドスペース法により測定した。その結果は Fig. 7 に示したように、モル比 1:1 以上の次亜塩素酸を作用するこ

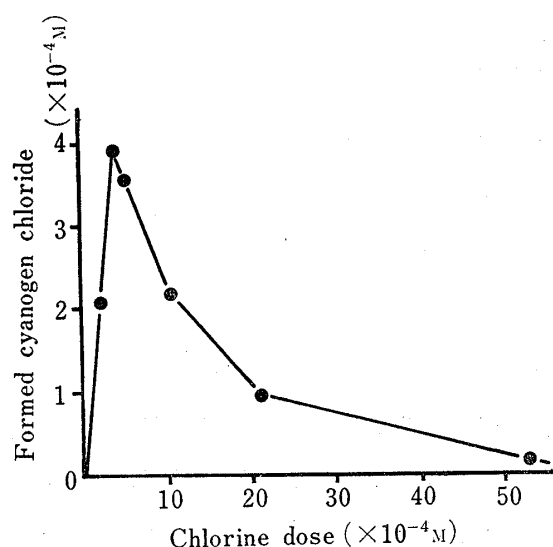


Fig. 7. Formation of Cyanogen Chloride in the Mixture of Cyanide and Hypochlorite

In a glass bottle, hypochlorite is added to the potassium cyanide ($3.849 \times 10^{-4} M$) in $1/75 M$ phosphate buffer (pH 7.0) solution, and the bottle is sealed with a silicone rubber. Cyanogen chloride in gaseous phase in the bottle was determined by gaschromatography with ECD after 30 min standing.

Concentration of formed cyanogen chloride is calculated as in the aqueous phase.

とによって、生成するクロルシアン量が減少した。この減少曲線の形は、グリシンに3倍モル以上の次亜塩素酸を作用させた時の結果（前報¹⁾ Fig. 5）と一致した。

6. グリシンの塩素消費量

グリシンに各濃度の次亜塩素酸を作用させた時の塩素消費反応は30分でほぼ完結する。Fig. 8に示したのは2時間反応後の残留塩素の測定結果である。モル比1:2から1:4の間では残留塩素が全く消失し、モル比1:2以下では結合型、モル比1:4以上では遊離型で存在していた。モル比1:4以上の遊離型残留塩素の測定値を結んだ直線は基線に対して45°となり、この直線と横軸の交点はモル比1:4.5の位置になった。

考 察

中性における低濃度のグリシンと次亜塩素酸の反応はFig. 8の結果からも明らかなように、グリシン1モルが最終的に4.5モルの塩素を消費して完結する。この値はNorman³⁾の報告に一致した。Normanはこの反応について、グリシンが最初の酸化を受けた結果シアンを生成し、シアンは蟻酸とアンモニアとなり、さらに蟻酸とアンモニアが二酸化炭素と窒素ガスに酸化されるものとしている。

グリシンからのシアン生成反応については、上記の他に Dakin²⁾により、 α -アミノ酸と活性塩素2モルの反応

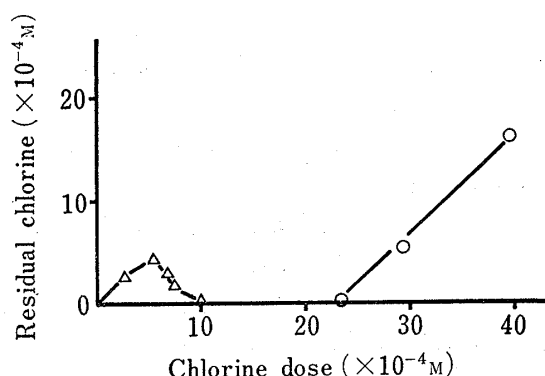


Fig. 8. The Residual Chlorine in the Mixture of Glycine and Hypochlorite

Hypochlorite reacted on glycine ($5 \times 10^{-4} M$) in $1/75 M$ phosphate buffer (pH 7.0). Residual chlorine was determined by the DPD-ferrous titrimetric method for differentiation of chlorine species into free chlorine, and combined chlorine.

Δ combined residual chlorine; $\circ$ free residual chlorine

で生成した *N*-ジクロルアミノ酸がニトリルに加水分解するという一般式での報告がある。

今回行った実験で、Fig. 1に示した DPD 発色に必要な KI 量、Fig. 2、Fig. 3に示した 250 nm の紫外吸収の経時測定の結果から、反応液中にモノクロルグリシンの存在することが明らかである。

また、Fig. 2に示した各種アミノ酸の *N*-モノクロル体の 250 nm の吸光度はグリシンのみ安定で、他のアミノ酸の場合は経時的に減少している。このことは、グリシンに対して等モル以下の塩素を反応させたときに塩素消費がなく、グリシンの分解もアンモニアの生成も認められないという前報¹⁾の結果と一致する。したがって、グリシンと次亜塩素酸の反応の第1段階で生成する *N*-モノクロルグリシンは、安定で Strecker 分解¹³⁾ 起こりにくいことを示している。Morris ら¹²⁾ もグリシンと次亜塩素酸の反応について、モル比 1:1 以下の場合ではほとんど塩素を消費しなかったと報告している。

Dakin ら¹⁴⁾ や Langheld¹⁵⁾ はグリシンの塩素処理でアルデヒド、アンモニアへの分解反応が起ることを報告した。また、Ogata ら¹⁶⁾ は $5 \times 10^{-3} M$ のグリシンに次亜塩素酸をモル比 1:1 で反応させ、2時間経過後の反応液と紫外線ランプを52時間照射した後の反応液での Strecker 分解によるアンモニアの生成を報告した。それぞれの反応濃度は前報¹⁾ および本報にくらべて高く、Dakin ら¹⁴⁾ や Langheld¹⁵⁾ の場合は 2000—50000 倍、Ogata ら¹⁶⁾ の場合は 10—250 倍である。モノクロルグリシンに Strecker 分解を起こさせるには、これらの報

告^{14,15,16)}のような濃度又は紫外線照射などの条件が必要だと考えられる。

グリシンに対して当モル以上の次亜塩素酸を作用させるという条件では, Fig. 1-c に示したように *N*-ジクロルグリシンが生成するため, Fig. 3 のように 250 nm の吸光度の減少がおこる。同時に Fig. 4 に示したように

時間の経過とともに残留塩素が減少してクロルシアンが生成する。

ニトリル生成機構については Zgliczynski ら¹¹⁾により, ジペプチドに次亜塩素酸を作用させたときの報告があり, これは次のような反応式で示されている。

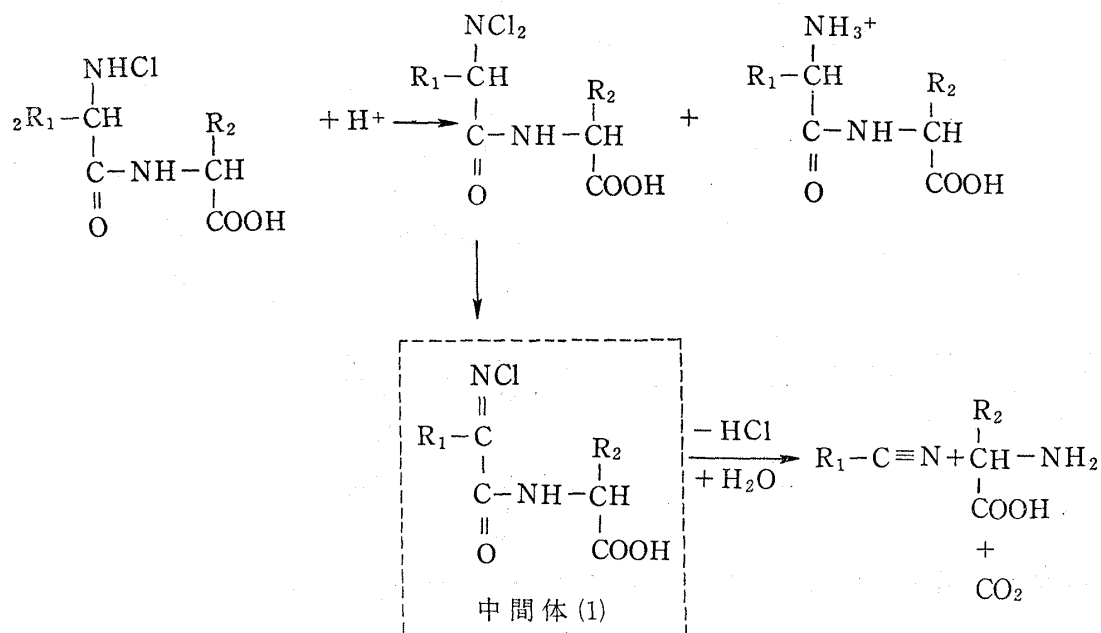


Chart Proposed by Zgliczynski *et al.*¹¹⁾

ジペプチドに次亜塩素酸を作用させて生ずるモノクロルペプチドが不均化によってジクロルペプチドと

なり, 比較的安定な中間体 (1) を形成する。これを加水分解するとニトリルとアミノ酸が生成する。¹¹⁾

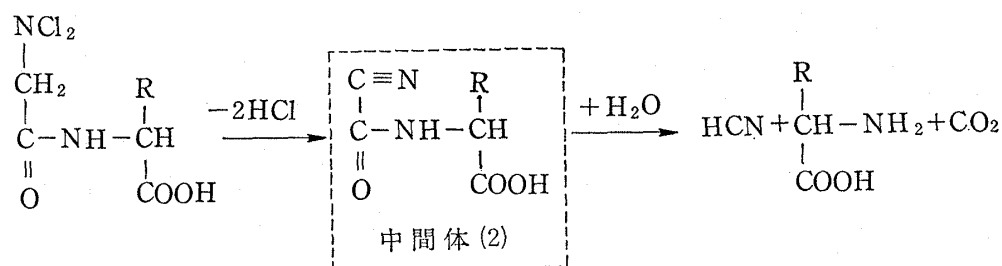


Chart Proposed by Zgliczynski *et al.*¹¹⁾

ジペプチドがグリシルアミノ酸の場合には, 生成したジクロルグリシルアミノ酸から安定な中間体 (2) が生成し, これを加水分解するとシアンとアミノ酸が生成する。¹¹⁾

グリシンに次亜塩素酸を作用させたとき, もし, *N*-ジクロルグリシンからシアンが生成する過程にグリシルアミノ酸と同じ反応過程があるとすれば, 中間体として $\text{H}-\text{C}-\text{COOH}$ または $\text{C}-\text{COOH}$ の存在が想定される。

また $\text{H}-\text{C}-\text{COOH}$ が生成したと仮定して, これがまず NCl 脱塩酸反応を起すとすれば $\text{C}-\text{COOH}$ が生成し, 脱炭酸反応が先におこれば *N*-クロルメチレンイミンとなるはずである。

DPD 発色初速度と添加 KI 濃度の関係を示した Fig. 1 と Fig. 5 とを比較すると, グリシクロラミンには *N*-モノクロルグリシンと *N*-ジクロルグリシンしか存在せ

ず、両者の中間の反応性をもつ *N*-クロルメチレンイミンの存在は認められない。また、グリシンの塩素消費量、塩素消費速度、クロルシアン生成速度と Fig. 6 の *N*-クロルメチレンイミンの塩素消費量、塩素消費速度、クロルシアン生成速度が一致しないことから、*N*-クロ

ルメチレンイミンの存在は否定できる。したがって、この物質を中間体とする反応経路は否定される。

前報に本報の実験結果を加えると、グリシンと次亜塩素酸の反応は次式に示す通りである。

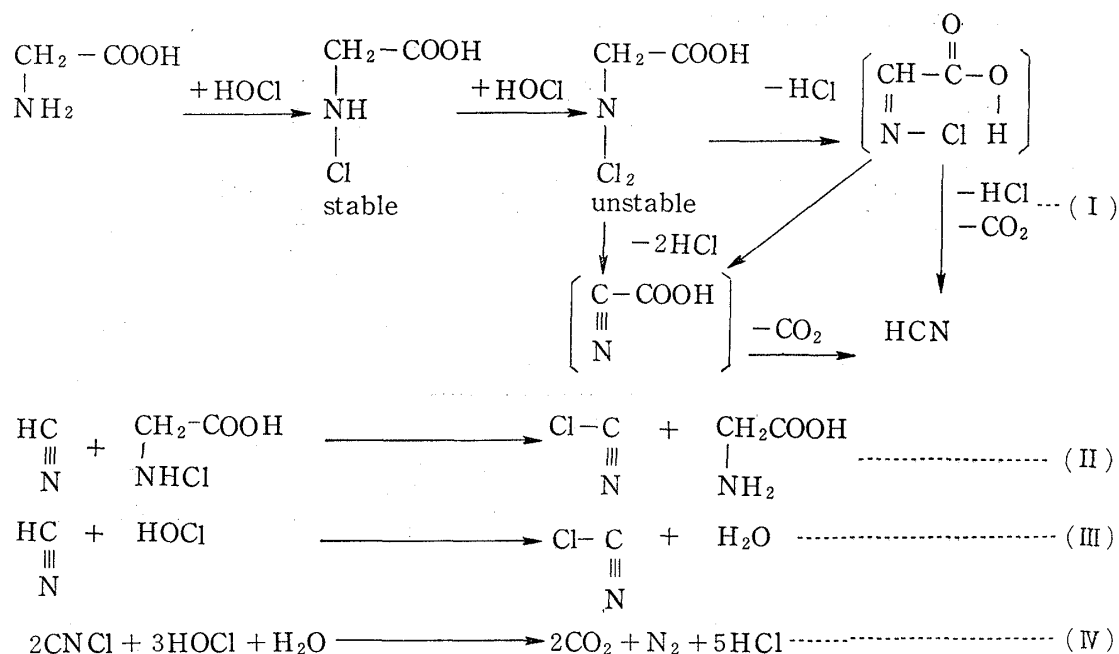


Chart Proposed by Present Authors

グリシンの場合には、*N*-モノクロルグリシンが不均化ではなく、遊離塩素による塩素化をうけて *N*-ジクロルグリシンとなり、これが脱炭酸反応を起すとともに、脱塩酸反応が起こってシアンが生成する (I)。生成したシアンはグリシンクロラミンの残留塩素によって塩素化される (II) か、過剰の次亜塩素酸によって塩素化され (III) てクロルシアンとなり、このクロルシアンは、さらに余剰の塩素で分解する (IV)。

各々の反応の塩素消費量は (I) の反応で 2 モル、(II) 又は (III) で 1 モル、(IV) で 1.5 モルであり、(I) - (IV) の反応による総塩素消費量は 4.5 モルとなる。この値は Fig. 8 の不連続点曲線から得られた値と一致する。

Fig. 8 でモル比 1:2 から 1:4 の間の残留塩素が全く消失していたのは、このモル比の間でクロルシアンの生成および分解反応が平行して進行したためである。

グリシンの不連続点曲線については、Palin⁹⁾ により 4 時間反応後のものが報告されている。これによると $7 \times 10^{-5} \text{ M}$ のグリシンの場合には 4 時間反応後でもモル比 1:2 から 1:4 の間で残留塩素が存在する。 $1 \times 10^{-5} \text{ M}$ のグリシンについての著者らの実験結果では、Palin⁹⁾ の結果よりもさらに残留塩素の割合が多かった。¹⁷⁾ これは Fig. 4 の結果からも示唆されたように、グリシンと次亜塩素酸の反応速度が両者の反応濃度に左右されるためであると考えられる。

引用文献および注

- 1) 澤村良二, 櫻井映子, 山本美枝子, 立川真理子, 長谷川 明, 衛生化学, **28**, 267 (1982).
- 2) H.D. Dakin, *Biochem. J.*, **10**, 319 (1916).
- 3) M.F. Norman, *Biochem. J.*, **20**, 524 (1936).
- 4) 松下千明, 山田康正, 久下芳生, 中本雅雄, 前田泰昭, 宗森 信, 日本化学会講演予稿集, 1979秋, p.108.
- 5) T. Stelmazynska, J.M. Zgliczynski, *Eur. J. Biochem.*, **92**, 301 (1978).
- 6) C.F. Cross, E.J. Bacon, *J. Chem. Soc.*, **1910**, 2404.
- 7) A.P.H.A., A.W.W.A., W.P.C.F., "Standard Methods for the Examination of Water and Waste-

- water," 14th ed., Washington, 1975, pp. 329—332.
- 8) A. T. Palin, *Water and Water Engineering*, **1950**, 151.
 - 9) A. T. Palin, *Water and Water Engineering*, **1950**, 248.
 - 10) W. S. Metcalf, *J. Chem. Soc.*, **71**, 1664 (1949).
 - 11) J. M. Zgliczynski, T. Stelmaszynska, J. Domanski, W. Ostrowski, *Biochem. Biophys. Acta*, **235**, 419 (1971).
 - 12) J. C. Morris, Ira Weil, R. H. Culver, Unpublished copy from senior author, Harvard Univ., (1952).
 - 13) A. Schonberg, R. Moubacher, *Chem. Rev.*, **50**, 261 (1952).
 - 14) D. H. Dakin, J. B. Cohen, M. Daufresne, J. Kenyon, *Proc. Roy. Soc. London (B)*, **89**, 232 (1916).
 - 15) K. Langheld, *Ber.*, **42**, 2360 (1909).
 - 16) Y. Ogata, M. Kimura, Y. Kondo, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **54**, 2057 (1981).
 - 17) 平木映子, 岡田真理子, 澤村良二, 日本薬学会第98年々会, 岡山, 1978年4月.