

Title	アンスロン試薬によるトリプトファンの呈色反応に関する研究(第1報)
Sub Title	Studies on the coloration of tryptophan by anthrone reagent. I.
Author	中村, 勇蔵(Nakamura, Yuzo)
Publisher	共立薬科大学
Publication year	1962
Jtitle	共立薬科大学研究年報 (The annual report of the Kyoritsu College of Pharmacy). No.6(1961)/7(1962) ,p.58- 64
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	
Genre	Technical Report
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00062898-00000006-0058

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

Table IV.—Dissociation Constants for Meconic Acid and Chelidonic Acid and the Dipole Moment of Meconic Acid

	Meconic Acid	Chelidonic Acid
pK ₁
pK ₂	2.23	2.36
pK ₃	10.10 ^a (10.08 ^b)
μ	5.19 D

^a Titration method. ^b Spectrophotometric method.

significant in view of the high alkaloidal content of opium. In the same connection, it is interesting to note that *Chelidonium majus* L., in which the alkaloids also are localized in the latex, contains chelidonic acid, another strong dibasic acid.

REFERENCES

- (1) Miyamoto, S., and Brochmann-Hanssen, E., United Nations' Secretariat, Document ST/SOA/SER.K 106.
- (2) Riegel, E. R., and Zwilgmeyer, F., in Blatt, A. H., "Organic Synthesis," Coll. Vol. 2, John Wiley & Sons, Inc. New York, N. Y., 1943, p. 126.
- (3) Sager, E. E., Schooley, M. R., Carr, A. S., and Acree, S. F., *J. Research Natl. Bur. Standards*, **35**, 521(1945)
- (4) Halverstadt, I. F., and Kumler, W. D., *J. Am. Chem. Soc.*, **64**, 2988(1942).
- (5) Lange, M. A., "Handbook of Chemistry," Handbook Publishers, Inc., Sadusky, Ohio, 1956, p. 1202.
- (6) Albert, A., "Heterocyclic Chemistry," The Athlone Press, University of London, 1959, p. 270.
- (7) Hunter, E. C. E., and Partington, J. R., *J. Chem. Soc.*, 1933, 87.

アンスロン試薬によるトリプトファンの呈色反応に関する研究 (第1報*)

中村 勇蔵

Studies on the Coloration of Tryptophan by Anthrone Reagent. I.

Yuzo NAKAMURA

アンスロン試薬による糖の定性ならびに定量分析については多数の報告があるが、著者は数種のアミノ酸の共存がこの反応に影響を与えることを知つたので、まずトリプトファンにつき、数種の糖の共存下に実験を行ない、その結果特異的な紫色を呈することを認めた。すでに Shetlar¹⁾ は血清中の多糖類定量の目的にアンスロン試薬を用いた場合に 530 mμ に吸収極大を有する呈色を認め、これがトリプトファンの共存に基因するのであり、したがつてアンスロン試薬による血清や組織中の多糖類定量に際しては、この影響を考慮すべきであることを指摘し、また Tuller²⁾ 等はこの反応を利用したタンパク質含有物、すなわち糖タンパク体あるいはその他のタンパク体が共存する糖の定量法を發表している。しかし従来この反応の条件、共存する糖およびアミノ酸の種類などによる影響によつて生ずる差違、またこの際形成される色素の性質などに

* 薬学雑誌 81巻6号に発表

1) M.R. Shetlar: *Anal. Chem.* **24**, 1844(1952).

2) E. F. Tuller, N. R. Keinding: *Ibid.* **26**, 875(1954).

については検討が行われていないので、著者はまず本反応について、反応条件および糖の種類による影響を検討し、さらに糖およびトリプトファン相互の量的比率をかえた場合の吸光度の変化について若干の知見を得た。本報告における結論を示すと、D-glucose と L-tryptophan とが同量共存の場合 530 m μ において最大の吸光度を示すための最適条件は Table I の a に示す条件であり D-glucose の他、他の糖類、D-galactose, L-rhamnose, D-glucurone, D-fructose, D-glucosamine 塩酸塩などを用いて、これらと L-tryptophan とを同量混合して吸光度の測定を行なった場合にも条件 a において六炭糖については D-glucose の場合と同様に 530 m μ で吸光度が最大となり、この場合 530 m μ の吸光度については六炭糖の D-fructose が最大であることが認められた。さらに L-tryptophan と糖の相互の比率をかえ 530 m μ における吸光度の変化を測定し、L-tryptophan を一定にして D-fructose 量をかえると糖の増加に比例して吸光度が増加し、逆に糖量を一定にして L-tryptophan 量をかえた場合には L-tryptophan 量が D-fructose 量の 2 倍以上になると直線的に比例して増大しないことを認めた。

本実験において、検液としては Table I に示す sample 中に D-glucose 50 γ と L-tryptophan 50 γ を含む水溶液について最も強い特異的呈色を示す条件を求め、試薬の量とその濃度および加熱時間について検討した。Table I は作用条件を示すもので、糖の定量に用いられる代表的条件³⁻⁵⁾ および試薬と上記水溶液の比率をかえたものである。

Table I で条件 a は 95v/v% H₂SO₄ 100 cc にアンスロン 0.2 g をとかけた液を試薬としその 4 ml に、検液として 2 ml 中に D-glucose 50 γ および D-tryptophan 50 γ を含む水溶液を加え 10 分間加熱した場合のことで、b, c, d もこれに準じて表示してある。

Table I. Experimental Conditions

Condition	Reagent			Reagent (ml.)	Sample (ml.) ^{a)}	Heating period (min.)
	Anthrone (g.)	H ₂ SO ₄ (v/v%)	(ml.)			
a	0.2	95	100	4	2	10
b	0.2	95	100	5	1	10
c	0.1	80	100	4.5	1.5	10
d	0.05	72	100	5	1	15

a) Volume of aqueous solution containing D-glucose 50 γ and L-tryptophan 50 γ

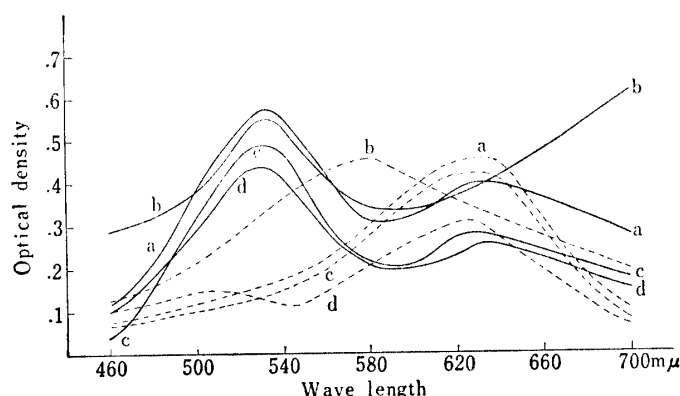


Fig. 1.

— D-glucose (50 γ) +
L-tryptophan (50 γ)
----- D-glucose
a, b, c, d Conditions of Table I

3) L. H. Koehler : Anal. Chem. **24**, 1576 (1952).

4) R. Johanson : *Ibid.* **26**, 1331 (1954).

5) N. V. Carrroll, R. W. Longley, J. H. Roe : J. Biol. Chem. **220**, 583 (1956).

Fig. 1 は各条件により 460~700 $m\mu$ における吸光度を測定した結果で、実線は検液として glucose および tryptophan 各 50 γ 共存の場合、点線は glucose のみを含む水溶液を用いた場合の結果を示している。glucose と tryptophan 共存の場合はいずれも 530 $m\mu$ に吸収極大が認められるが、糖のみの吸収極大は条件 a, c, d では 630 $m\mu$ にあるのに対し、b では 580 $m\mu$ に吸収極大が認められる。

以上の条件中では a および b が glucose と tryptophan 共存の場合の 530 $m\mu$ における吸光度が大であり、この両条件について加熱時間の検討を行なった。沸騰水浴中の加熱時間を 5~20 分間にかえた場合の 530, 630 $m\mu$ (条件 a), および 530, 580 $m\mu$ (条件 b) における吸光度を測定した結果、加熱時間が長くなるほど 530 $m\mu$ における吸光度は増大し、630, 580 $m\mu$ における吸光度は減少することが認められたが、a の場合は 10 分、b の場合は 5 分の加熱で、それ以上加熱した場合と大差はない。試薬と検液を室温ではげしく混合後放冷した場合およびこれをさらに沸騰水浴中で 5~20 分間加熱した場合についても検討したが、この場合も同様の傾向が認められた。しかし室温で試薬と検液をはげしく混合し放冷したのみでは吸光度の数値のばらつきが大きく再現性に乏しい。糖として fructose を用いて同様の条件で反応を行なって結果をみたが、この場合も glucose を用いときと同様の結果が得られた。条件 a により、tryptophan と数種の単糖類各 50 γ 共存の検液を用いて反応を行なった結果を Fig. 2 に示す。

使用した糖は D-glucose, D-galactose, D-mannose, D-fructose, L-rhamnose, D-glucurone, D-glucosamine 塩酸塩であり、Fig. 3 は各糖類のみ 50 γ 含有する検液を用いた場合の反応結果を示す。tryptophan のみの存在でも、アンスロン試薬により 530 $m\mu$ に弱い吸収極大が認められるが、ある種の糖の存在で 530 $m\mu$ における吸光度は非常に増大することは明らかである。

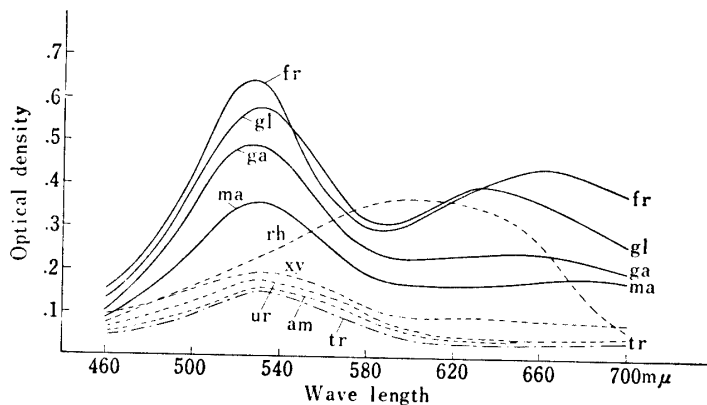
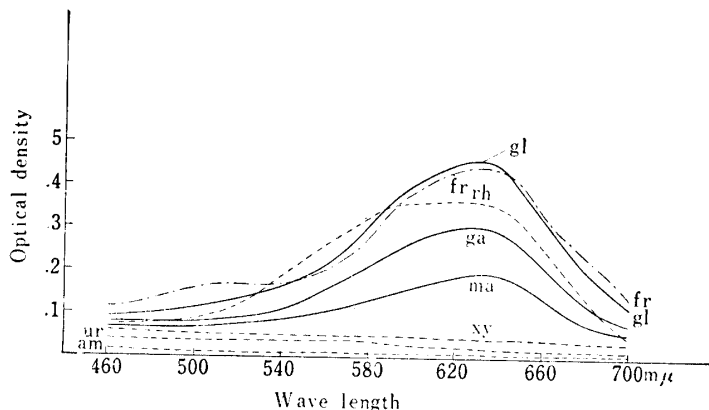


Fig. 2.

Absorption Spectra
(460~700 $m\mu$; condition a)

fr : D-fructose + L-tryptophan
rh : L-rhamnose + "
ga : D-galactose + "
gl : D-glucose + "
ma : D-mannose + "
xy : D-xylose + "
ur : D-glucurone + "
am : D-glucosamine·HCl + "
tr : L-tryptophan



F.g. 3.

Absorption Spectra
(460~700 $m\mu$; condition a)

fr : D-fructose
gl : D-glucose
ga : D-galactose
ma : D-mannose
rh : L-rhamnose
xy : D-xylose
ur : D-glucurone
am : D-glucosamine·HCl

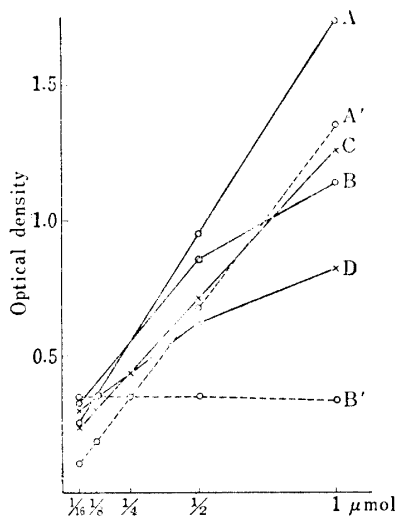


Fig. 6.

Optical Density and Ratio of L-Tryptophan
and D-Glucose or D-Fructose

Curve	Condition	Wave length (m μ)	L-Tryptophan (μ mole)	D-Fructose
A	a	530	1/4	(1/16, 1/8, 1/4, 1/2, 1)
A'	"	630	"	"
B	"	530	(1/16, 1/8, 1/4, 1/2, 1)	1/4
B'	"	630	"	"
D-Glucose				
C	b	530	1/4	(1/16, 1/8, 1/4, 1/2, 1)
D	"	530	(1/16, 1/8, 1/4, 1/2, 1)	1/4

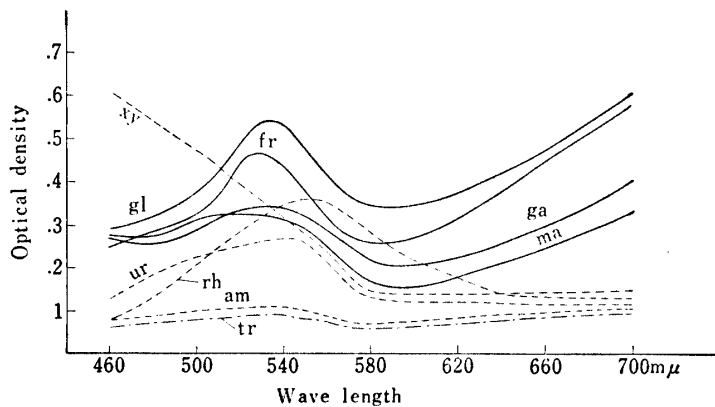


Fig. 4.

Absorption Spectra

460~700 m μ ; condition b)

gl : D-glucose + L-tryptophan
 fr : D-fructose + "
 ga : D-galactose + "
 ma : D-mannose + "
 tr : L-tryptophan + "
 xy : D-xylose + "
 ur : D-glucurone + "
 rh : L-rhamnose + "
 am : D-glucosamine·HCl + "

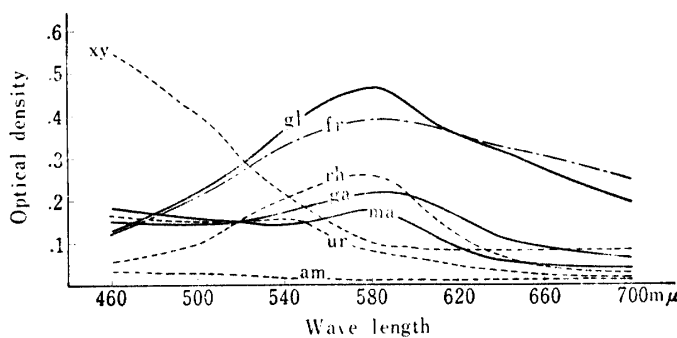


Fig. 5.

Absorption Spectra

(460~700 m μ ; condition b)

fr : D-fructose
 gl : D-glucose
 xy : D-xylose
 ga : D-galactose
 ma : D-mannose
 rh : L-rhamnose
 ur : D-glucurone
 am : D-glucosamine·HCl

この効果は hexose のみに認められ、糖としては D-fructose の場合が最も強く呈色し、D-glucose, D-galactose, D-mannose の順に弱くなる。

条件 b による反応結果を Fig. 4 に示す。Fig. 5 は糖のみ存在する場合の反応結果である。この結果からもこの条件で hexose のみが 530 m μ における吸収極大を示す呈色反応に関与し、糖としては D-glucose の場合が最も強く D-fructose がつぎ、D-galactose, D-mannose の効果は弱いことが認められる。

以上の結果から 530 m μ に吸収極大をもつ特異的呈色は条件 a によつて最も強く認められ、共存する糖としては D-fructose が最も強い効果を示し、D-glucose がこれにつぐことが判つた。またこれらの実験で L-tryptophan の代わりに DL-tryptophan を使用した場合の結果もみたが、何等差異は認められなかつた。

Fig. 6 は検液中の L-tryptophan と糖との量的比率をかえた場合の吸光度の変化を測定した結果を示すものである。条件 a で検液中の L-tryptophan 量を 0.25 μ mol に一定して、共存する D-fructose の量を 1, 0.50, 0.25, 0.125, 0.0625 μ mol の 5 段階にかえた場合の 530 m μ における吸光度の変化を A で示し、630 m μ における吸光度の変化を A' で示す、検液中の D-fructose を 0.25 μ mol に一定して共存する L-tryptophan の量を同様に 1~0.0625 μ mol にかえた場合の 530 m μ における吸光度の変化を B で示し、630 m μ における吸光度の変化を B' で示す。C は条件 b で L-tryptophan 量を 0.25 μ mol として D-glucose 量を同様に 1~0.0625 μ mol にかえた場合の 530 m μ における吸光度の変化を表わし、D は条件 b で D-glucose 量を 0.25 μ mol として L-tryptophan 量を同様に 1~0.0625 μ mol にかえた場合の 530 m μ における吸光度の変化を示すものである。この実験の検体量では、L-tryptophan 量を一定にして糖量をかえた時は 530 m μ における吸光度は糖の増加に対して直線的に比例して増大することが認められる。糖量を一定にして L-tryptophan 量を変化させた場合は L-tryptophan 量が少ないときは 530 m μ における吸光度は L-tryptophan 量の増量にほぼ直線的に比例して増加することが認められるが、L-tryptophan 量の mol 濃度が糖の 2 倍以上になると吸光度は直線的に比例しては増大しない。条件 a による反応で 630 m μ における吸光度は L-tryptophan 量を一定にして糖量を増加させた場合にはこれに直線的に比例して増大するが、糖量を一定にして L-tryptophan 量を変化させた場合にはほとんど一定の数値を示した。

実験の部

測定条件 2×17 cm の共栓付硬質硝子管に試薬を入れて氷水中で冷却しながら検液を加え、発熱を避けて徐々に混合後、室温で 2~3 min 間放置してから、はげしく沸とうさせた水浴中にひたして、一定時間加熱、加熱終了後、直ちに流水および氷水で速やかに室温まで冷却し、30 min ないし 1 hr 後に日立 EPU 2 型分光光度計および日立 EPS 2 型自記分光光度計を用いて吸光度測定しい。

Table II. Effect of Heating Period on Optical Density

Condition	Wave length (m μ)	Heating period (min.)			
		5	10	15	20
a	530	0.364	0.552	0.564	0.578
	630	0.330	0.380	0.308	0.288
b	530	0.535	0.543	0.545	0.550
	580	0.390	0.380	0.380	0.365

Sample used was a mixture of 50 γ of D-glucose and 50 γ of L-tryptophan.

加熱時間の検討 D-glucose および L-tryptophan 各 50 γ を含む水溶液を検液として加熱時間をかえた場合の条件 a および b に呈色の吸光度測定結果を Table II に示す。

試薬と検液を室温ではげしく混合後放冷の場合およびさらに加熱した場合の結果を Table III に示す。

糖として D-glucose の代わりに D-fructose を用いて同様の条件で呈色させた場合の吸光度測定結果を Table IV および Table V に示す。

Table III. Effect of Heating Period on Optical Density

Condition	Wave length (m μ)	Heating period (min.)				
		0	5	10	15	20
a	530	0.405	0.470	0.545	0.576	0.578
	630	0.340	0.360	0.350	0.302	0.275
b	530	0.250	0.513	0.561	0.565	0.570
	580	0.130	0.360	0.317	0.310	0.305

Exptl. method: Samples (D-glucose, 50 γ and L-tryptophan 50 γ) and reagent were mixed vigorously at room temp., stood still, and heated.

Table IV. Effect of Heating period on Optical Density

Condition	Wave length (m μ)	Heating period (min.)			
		5	10	15	20
a	530	0.598	0.645	0.665	0.679
	630	0.405	0.398	0.355	0.321
b	530	0.446	0.453	0.472	0.480
	580	0.337	0.314	0.310	0.302

Sample used was a mixture of 50 γ of D-fructose and 50 γ of L-tryptophan.

Table V. Effect of Heating period on Optical Density

Condition	Wave length (m μ)	Heating period (min.)				
		0	5	10	15	20
a	530	0.482	0.570	0.615	0.632	0.636
	630	0.441	0.344	0.264	0.227	0.206
b	530	0.271	0.390	0.468	0.485	0.508
	580	0.325	0.320	0.311	0.305	0.304

Exptl. method was the same as that of Table III, except D-fructose was used instead of D-glucose.

Summary

1) Conditions necessary for the strongest specific coloration were examined for application of anthrone reagent to aqueous solution containing 50 γ of D-glucose and 50 γ of L-tryptophan, and the amount of reagent to be used, concentration of the reagent, and period of heating were determined.

2) In optimal conditions and in the presence of an equal amount of D-glucose and L-tryptophan, the optical density was found to become the maximum at 530 m μ .

3) Optical density was measured in a solution of equal amounts of L-tryptophan and several kinds of sugars other than D-glucose. The result same as that described in (2) was obtained with hexoses and D-fructose showed the greatest absorbance.

4) Quantitative ratio of L-tryptophan and sugar in the sample solution was changed and variation in the absorbance at 530 m μ was measured. When the amount of L-tryptophan was made constant and the amount of D-fructose varied, absorbance increased linearly in proportion to the increase of sugar but when the amount of D-fructose was made constant and the amount of L-tryptophan varied, absorbance

did not increase proportionally unless the amount of L-tryptophan was twice that of D-fructose.

アンスロン試薬によるトリプトファンの呈色反応に関する研究 (第2報)*

中村 勇 蔵

Studies on the Coloration of Tryptophan by Anthrone Reagent. II.

Yūzō NAKAMURA

著者は前報で、ヘキソースとの共存で、トリプトファンがアンスロン試薬により、特異的な呈色を示す反応について、反応条件の検討、糖の種類による吸光度の差異ならびに糖とトリプトファンとの量的比率をかえた場合の吸光度の変化等について得られた知見を報告したが、本報ではトリプトファン以外の通常自然界に見出される18種類のアミノ酸について、この呈色反応におよぼす影響を調べた。

グルコースのアンスロン試薬による呈色反応について、Morris¹⁾ は蛋白質が共存しても影響はないと述べているが、既に Shetlar²⁾, Tuller 等³⁾ および著者等の報告で明らかのように、トリプトファンが共存するときは630 m μ における吸光度は減少し、530 m μ に吸収極大を有する呈色を生ずる。Tuller 等³⁾ は糖の本試薬による反応に際しアミノ酸の影響について、トリプトファンの他に、フェニルアラニンおよびチロジンについて試験した結果、フェニルアラニンは

Table 1.

Sample	Wave length (m μ)			
	530	550	580	630
glucose	0.170	0.210	0.300	0.420
glu. + glycine	0.170	0.212	0.306	0.420
glu. + DL-alanine	0.165	0.229	0.303	0.416
glu. + DL-valine	0.165	0.215	0.317	0.431
glu. + DL-leucine	0.167	0.211	0.323	0.430
glu. + DL-isoleucine	0.171	0.210	0.305	0.414
glu. + L-serine	0.168	0.209	0.316	0.415
glu. + DL-threonine	0.165	0.204	0.300	0.410
glu. + L-phenylalannine	0.170	0.210	0.305	0.413
glu. + L-tyrosine	0.165	0.204	0.310	0.414
glu. + L-glutamic acid	0.162	0.202	0.310	0.421
glu. + L-aspartic acid	0.160	0.201	0.300	0.417
glu. + L-proline	0.180	0.218	0.308	0.410
glu. + L-hydroxyproline	0.180	0.212	0.300	0.408
glu. + DL-methionine	0.182	0.225	0.326	0.446
glu. + L-cysteine·HCl	0.168	0.210	0.307	0.428
glu. + L-arginine·HCl	0.160	0.203	0.321	0.433
glu. + L-lysine·HCl	0.158	0.210	0.326	0.429
glu. + L-histidine·HCl	0.165	0.205	0.313	0.430

- 1) D. L. Morris : Science **107**, 254(1947). 2) M. R. Shetlar : Anal. Chem. **24**, 1844(1952).
3) E. F. Tuller, N. R. Keiding : *Ibid.* **26**, 875(1954).

*薬学雑誌 81 卷 6 号に発表