

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3報)
Sub Title	Studies on the coloration of tryptophan by anthrone reagent. III.
Author	中村, 勇蔵(Nakamura, Yūzō)
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.66- 73
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	
Genre	Technical Report
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00062898-00000006-0066

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.

glycine, DL-alanine, DL-valine

DL-leucine, DL-isoleucine, DL-threonine, L-phenylalanine (日本化学薬品製)

L-serine, L-tyrosine, L-glutamic acid, L-aspartic acid, L-proline, L-hydroxyproline, DL-methionine,

L-arginine·HCl, L-lysine·HCl, L-histidine·HCl (味の素製)

L-cysteine·HCl (和光純薬製)

以上の結果を Table I, II に示す. Table I はグルコースと各アミノ酸共存の 530, 550, 580 および 630 m μ における吸光度を示し, Table II はグルコースおよびトリプトファンとトリプトファン以外のアミノ酸共存の場合の同様波長における吸光度を示す. 数値はメチオニンおよびシステイン·HCl 共存の場合は 10 回, 他のアミノ酸共存の場合は 3 回測定の実測値である.

Summary

The specific coloration of hexose with anthrone reagent, in the presence of tryptophan and changes in optical rotation were described in the preceding paper. The measure of optical rotation was carried out in the presence of amino acids other than tryptophan and it was found that other amino acid had almost no effect on this reaction.

アンスロン試薬によるトリプトファンの呈色反応 (第 3 報)*

中村 勇蔵

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

Yūzō NAKAMURA

グルコースとトリプトファン共存時のアンスロン試薬による呈色反応で形成される色素の性質とその構造について検討した結果を報告する.

反応条件は第 1 報¹⁾ Table I-a によつた. 第 1 報において, 加熱時間 10 分以上では呈色に著しい増大は認められないことを報告したが, 今回は沸騰水浴中の加熱時間を 40 分まで延長して比較した. その結果を Table I に示す. 検体量はおのおの 0.25 μ mol とした. 本呈色反応の吸収極大波長 530 m μ における吸光度は加熱時間の増加に伴つて, 徐々に増大するのに対して, 糖のみにアンスロン試薬を作用させたときの吸収極大波長である 630 m μ に対する吸光度は次第に減少することが判つた.

Table I. Optical Density at 530 m μ and 630 m μ by Increasing of Heating Period

Heating period (min.)	10	20	30	40
Wave length (m μ)				
530	0.502	0.520	0.545	0.568
630	0.298	0.245	0.232	0.227

グルコースおよびトリプトファン各 1 mg を含む水溶液 2 ml を検液として, 試薬中のアンスロン量を変えて加熱し, 冷却後 20 倍希釈して吸光度を測定した結果を Table II に示す. 検液

1) 中村: 薬誌 81, 846 (1961) ; 本年報 58.

* 薬学雑誌 82 巻 5 号に発表.

1 mol に対し, アンスロン 1 mol 以上では呈色の著しい増大は認められなかつた.

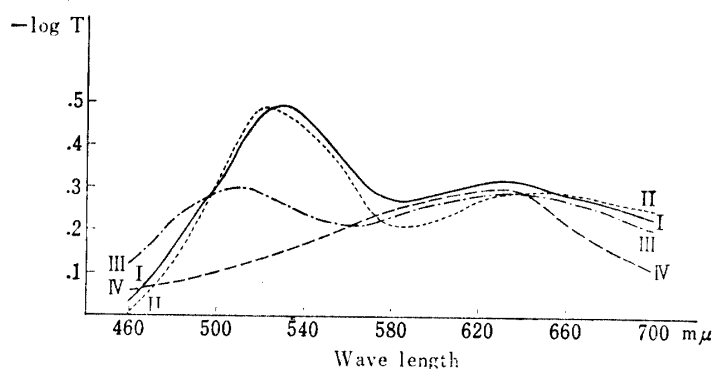
Table II. Optical Density at 535 m μ and 630 m μ by Increasing of Anthrone

Wave length (m μ)	0.5	1	2	3	4
530	0.360	0.560	0.634	0.702	0.706
630	0.138	0.260	0.295	0.320	0.328

つぎにトリプトファンに代りに, これと類似構造を有する数種の物質をそれぞれ使用した場合の呈色による吸収曲線を示す. Fig. 1 はグルコース共存の場合で, トリプタミンはトリプトファンと非常に類似した呈色を示している.

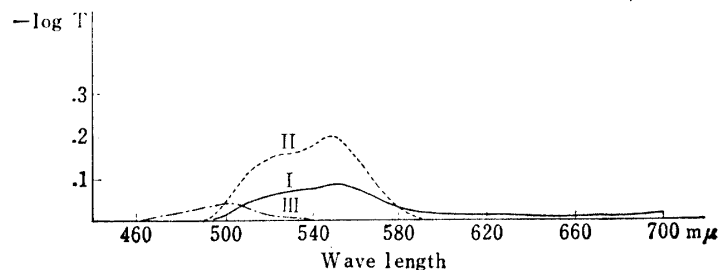
インドール酢酸では 510 m μ に極大をもつ吸収曲線が得られた. 630 m μ 付近における吸収は 4 物質の場合いずれも類似していて, インドールの場合には他に吸収極大を示さなかつた. Fig. 2 は各物質のみによるアンスロン反応の結果で, トリプトファンは 550 m μ に吸収極大をもつ弱い呈色が認められるのに対し, トリプタミンは同型の吸収曲線で約 2 倍の吸光度を示した. インドール酢酸はさらに短波長側に極めて弱い吸収が認められるがインドールの場合には全く呈色は認められない.

Fig. 1. Absorption Spectra
(460~700 m μ , at the Conditions of Table I-a)



- I : D-glucose $\frac{1}{4}$ μ mol. + L-tryptophan $\frac{1}{4}$ μ mol.
 II : D-glucose $\frac{1}{4}$ μ mol. + L-tryptamine-HCl $\frac{1}{4}$ μ mol.
 III : D-glucose $\frac{1}{4}$ μ mol. + 3-indoleacetic acid $\frac{1}{4}$ μ mol.
 IV : D-glucose $\frac{1}{4}$ μ mol. + indole $\frac{1}{4}$ μ mol.

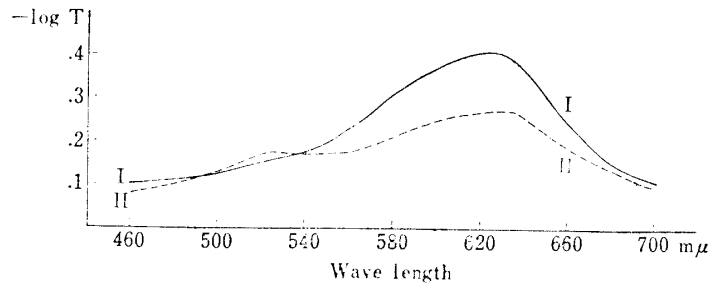
Fig. 2. Absorption Spectra
(460~700 m μ , at the Conditions of Table I-a)



- I : L-tryptophan $\frac{1}{4}$ μ mol.
 II : L-tryptamine-HCl $\frac{1}{4}$ μ mol.
 III : 3-indoleacetic acid $\frac{1}{4}$ μ mol.

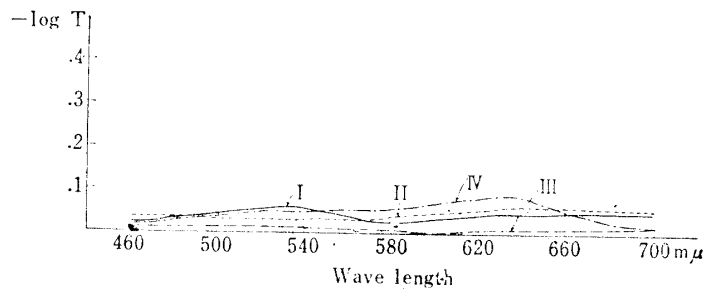
百瀬等²⁾はグルコースのアンスロン反応を研究して生成色素を単離し、その構造を推定しているがグルコース共存時のトリプトファンのアンスロン反応により生成する色素と、これとの関係を検討する目的で試料各々 0.25 mol を用いてつぎの実験を行なった。まずグルコースにアンスロン試薬を加えて反応させ、呈色液の吸収曲線測定後、こたにトリプトファンを加え、再び10分間加熱反応させて、吸収曲線を測定した。結果は Fig. 3 に示すように、糖のアンスロン反応によつて生ずる 630 m μ に吸収極大を有する呈色はトリプトファン添加により、かなり減少するが 530 m μ 付近の吸収にはほとんど変化が認められない。同様にトリプトファンにアンスロン試薬を加えて反応させた後グルコースを加え、再び加熱反応させた場合およびトリプトファンとグルコースを硫酸と加熱後、アンスロン試薬を加えて再び加熱反応させた場合について、その呈色の吸収曲線を測定した結果を Fig. 4 に示す。いずれも 530 m μ に吸収極大を有する呈色は認められなかつた。

Fig. 3. Absorption Spectra
(460~700 m μ , heating period; 10 min.)



I : D-glucose $\frac{1}{4}$ μ mol./2 ml. + 0.2% anthrone/H₂SO₄ (2 : 1) 4 ml.
II : I + L-tryptophan: $\frac{1}{4}$ μ mol./H₂SO₄ (2 : 1) 2 ml.

Fig. 4. Absorption Spectra (460~700 m μ , heating period : 10 min.)



— I : L-tryptophan $\frac{1}{4}$ μ mol./2 ml. + 0.2% anthrone/H₂SO₄ 4 ml.
..... II : I + D-glucose $\frac{1}{4}$ μ mol./H₂SO₄ (2 : 1) 2 ml.
- - - III : (D-glucose $\frac{1}{4}$ μ mol. + L-tryptophan $\frac{1}{4}$ μ mol.)/2 cc. + H₂SO₄ 4 ml.
- · - IV : III + 0.2% anthrone/H₂SO₄ (2 : 1) 4 ml.

以上の結果から本呈色反応はグルコース、トリプトファンおよびアンスロンの三者が同時に共存して、硫酸の存在で加熱され反応して生成する色素と考えられる。

つぎに本反応により生成した色素の性質と構造を知る目的でその単離を試みた、グルコース、トリプトファンおよびアンスロンの同量を 64% H₂SO₄ と加熱後、5 倍量の水にかきまぜながら

2) T. Momose, Y. Ueda, K. Sawara, A. Sugi : Pharm. Bull. (Tokyo) 5, 31(1957).

徐々に注加し、生じた沈澱を吸引濾過後、酸性がなくなるまで水洗し減圧乾燥して淡褐色の粉末を得た。この物質をクロロホルムを用いて抽出後、残渣をアンモニア処理して zone electrophoresis にかけた。結果を Fig. 5 に示す。泳動体は 5 mm 幅に切りとり水で抽出して抽出液の 430 m μ における吸光度および抽出液に硫酸を加えて発色させた液の 530 m μ における吸光度を比較したもので、中央より陽極側へ 3 cm ないし 4 cm の位置から得られた抽出液に塩酸を加えて酸性として沈澱を生じさせ遠心分離後、吸引濾過し、繰返して水洗して酸性を除き減圧乾燥して黒褐色の粉末を得た (以下 FA と略記)。FA に約 10 倍のアンモニア飽和メタノールを加え、アンモニアを導通しながら、さらに数滴の水を加えると完全に溶解させることができる。この溶液を暫時放置後、常温で減圧濃縮乾固させて溶媒およびアンモニアを除去し褐色の粉末を得た (以下 FB と略記)。

FA および FB は硫酸による強い紫の呈色を示す。

Fig. 6 は各種濃度の硫酸による FB の 3 万倍の希釈度の溶液の呈色曲線で、530 m μ に極大をもつ呈色は硫酸濃度の増大に伴って強くなり、80% で最大となり、また 20% 以下の硫酸濃度ではこの呈色は全く認められない。濃厚な硫酸による呈色液を水で希釈すると沈澱を生じて、未変化のまま回収することができる。ゆえにこの呈色は、FA に濃硫酸が作用して生ずる可逆的な構造の変化によると考えられる。

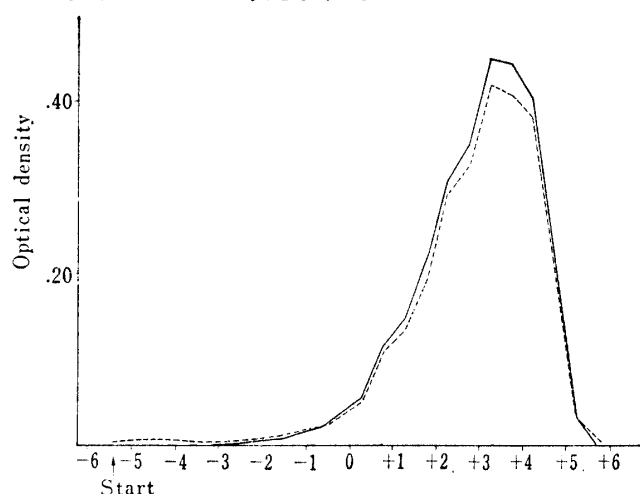


Fig. 5.
Optical Density of Each Fraction by
Zone Electrophoresis

— : at 530 m μ (30% H₂SO₄, ×1200)
- - - : at 430 m μ (H₂O, ×400)

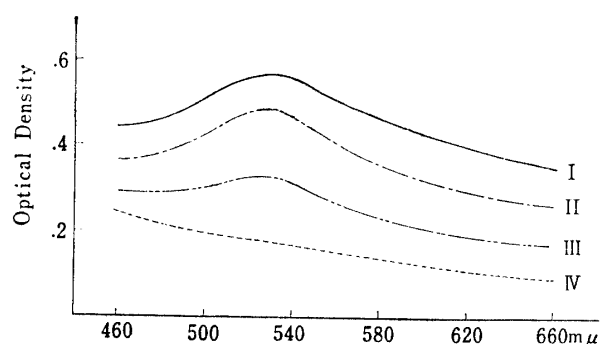


Fig. 6.
Absorption Spectra of FB-Sulfuric
Acid Solution

I : 80% H₂SO₄
II : 60% H₂SO₄
III : 40% H₂SO₄
IV : 20% H₂SO₄

FB は pH 8 の磷酸緩衝液を用いて 0.4mA/cm, 2 時間濾紙電気泳動を行ない、80% H₂SO₄ で spray して、陽極方向に移動した 1 箇のスポットを検出した。FB はアルカリ処理によりアンモニアの発生が認められた。FA のアンモニア処理によつてアンモニウム塩を形成して、水に可溶

性となつたものと考えられる。分子量測定および元素分析値から $C_{96}H_{110}N_{10}S_2O_{36}$ の分子式が推定され、FA は FB からアンモニウム基がとれた化合物にして元素分析値から $C_{96}H_{104}N_8S_2O_{36}$ の分子式が推定される。

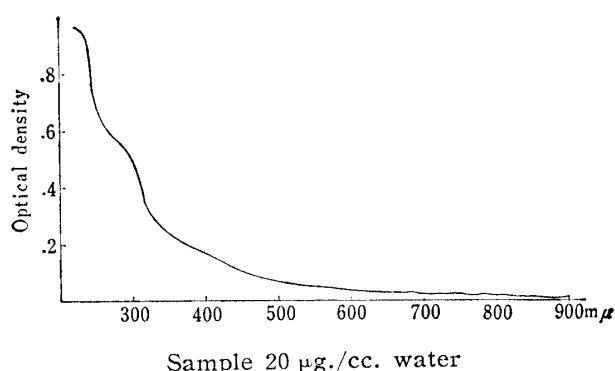
FB は有機溶媒にはほとんど不溶で加熱しても溶融しない。高温で分解し昇華物を生ずる。減圧下加熱して得られた分解昇華物を熱ベンゼンで抽出し、溶媒留去後、ベンゼンから再結晶を繰返して淡黄色針状晶を得た。本結晶は混融試験、元素分析値および IR スペクトル測定結果からアントラキノンであることを確認した。減圧下加熱時の昇華残留物は硫酸による呈色反応は全く認められない。

FB を封管中で塩酸と加熱して不溶物を汙別後、汙液から塩酸を除去し、ペーパークロマトグラフィーにより、ニンヒドリン陽性物質の検出を試みたが、トリプトファンおよびトリプタミンとは異なるスポットの存在を認めた、FB は酸分解に強く抵抗し多量の不溶物を回収したが、この不溶物は硫酸による呈色反応は全く認められない。

FB を得たと同様の方法でトリプタミン、グルコース、アンスロンを硫酸中で加熱し、同様に処理して淡褐色の粉末を得たが、この物質は各種溶媒に不溶であり、アルカリにも溶解しない。また濃厚な硫酸にも難溶であるが、トリプトファンの場合と類似の紫色の呈色を示す。元素分析値も FA および FB と異なり窒素および硫黄の値がそれらより大である。

FB の水溶液は紫外部および可視部を通じてなんら特徴的な吸収を示さない (Fig. 7)。

Fig. 7. Absorption Spectra of FB-Water Solution



トリプトファンは 280 mμ に吸収極大を有することが知られているが、この曲線中 280 mμ に唯一の段が認められるのは FB 中のトリプトファンに由来する部分の影響と考えられる。

Fig. 8 および Fig. 9 に FA および FB の IR スペクトルを示す。

FA はヒドロキサム酸形成によるスルホン酸の呈色反応陽性であり、トリプトファンおよび糖に由来する分解生成体とアンスロンとが結合し、FB の分子量と窒素含有量とから、トリプトファンに由来する部分は 4 個からなる重合体で、FB は FA に存在する 2 個のスルホン基がアンモニウム塩を形成して、水に可溶性となつたものと推定される。このことはキールダール法ならびに酸滴定によるアンモニア定量とも一致する。

トリプタミンは本呈色反応に対して、トリプトファン類似の効果を示すが、この両物質のうける変化は明らかに異なるものと認められる。

実 験 の 部

試薬量の影響 アンスロン 0.5 mg, 1 mg, 2 mg, 3 mg および 4 mg をそれぞれ 95% H_2SO_4 4 ml に溶

Fig. 8. Infrared Spectrum of FA

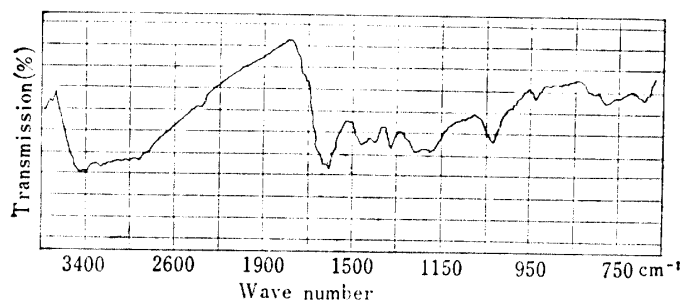
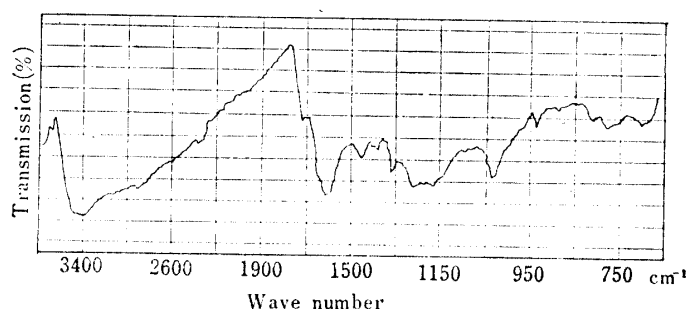


Fig. 9. Infrared Spectrum of FB



解し、 2×17 cm の共栓付硬質硝子管に入れて、氷水中に冷却しながら各々にグルコースおよびトリプファン各 1 mg を含む水溶液を 2 ml 加え、発熱をさけて徐々に混合後、室温で数分間放置してから、はげしく沸騰させた水浴中にひたして 10 min. 加熱し、終了後直ちに水および氷水で速かに室温まで冷却し、半容の水で希釈した H_2SO_4 を加えて 20 倍に希釈し、日立 EPU 2 型分光光度計で吸光を測定した。

検体と試薬との作用時間 混合、加熱、冷却の操作はすべて上記と同様にした。

吸収曲線は日立 EPS 2 型自記分光光度計を用いて測定した。

(i) グルコース 45 γ を含む水溶液 2 ml を 0.2% アンスロン H_2SO_4 溶液 4 ml に加え混合、10 min. 加熱後、吸収曲線を測定。この液にトリプトファン 51 γ を含む H_2SO_4 ($\text{H}_2\text{SO}_4 : \text{H}_2\text{O} = 2 : 1$) 2 ml を加え、混合し再び 10 min 加熱後、吸収曲線を測定。

(ii) トリプトファン 51 γ を含む水溶液 2 ml を 0.2% アンスロン H_2SO_4 溶液 4 ml に加え混合、10 min. 加熱後、吸収曲線を測定。この液にグルコース 45 γ を含む H_2SO_4 ($\text{H}_2\text{SO}_4 : \text{H}_2\text{O} = 2 : 1$) 2 ml を混合し、再び 10 min. 加熱後、吸収曲線を測定。

(iii) グルコース 45 γ およびトリプトファン 51 γ を含む水溶液 2 ml を H_2SO_4 4 ml に加え、混合、10 min. 加熱後、吸収曲線を測定。

この液に、0.2% アンスロン H_2SO_4 (2 : 1) 溶液 2 ml を加えて混合し、再び 10 min 加熱後、吸収曲線を測定。

反応生成体の分離 アンスロン 10 g を H_2SO_4 300 ml に溶解し、グルコース 10 g およびトリプトファン 10 g を 2% H_2SO_4 150 ml に溶解した液と冷却下発熱をさけて混合し、 $90 \sim 100^\circ$ に 10 min. 加熱後、室温まで冷却し、5 倍量の水にかきまぜながら徐々に注加し、放置後、吸引濾過して沈殿を得。酸性がなくなるまで繰り返し水洗後、減圧乾燥して、淡褐色粉末 23 g を得た。この粉末をソックスレー油出器を用いて、抽出液にほとんど着色が認められなくなるまで CHCl_3 で繰返えし抽出後、残留物を減圧乾燥し、得られた褐色粉末から 1 g をとり、 NH_3 飽和 MeOH 10 ml を加え、一昼夜放置後、吸引濾過し、濾紙上の物質を MeOH で洗った後、減圧乾燥して褐色粉末 0.85 g を得た。この物質 0.2 g を phosphate buffer (pH 8, $\mu = 0.05$)

2 ml に溶解し, zone electrophoresis にかけた. 支持体は予め buffer および水で洗ったパレイシヨでんぶんを用い, $45 \times 5 \times 1.5$ cm の槽を用いて中央より陰極方面へ 5~5.5 cm の部分を原点として, 20 mA, 640 V, 4 hr 通電し, 終了後, 5 mm 幅に切りとつて各部を水で抽出し 20 ml とした.

Fig. 5 は抽出液 0.1 ml を 10 倍希釈し, H_2SO_4 5 ml を加えて呈色させた液の $530 \text{ m}\mu$ における吸光度測定結果および抽出液の 20 倍水希釈液の $430 \text{ m}\mu$ における吸光度測定結果を示す.

Fig. 10 は FB の水溶液の $420 \text{ m}\mu$ における吸光度測定結果で濃度に直線的に比例することがわかる. 各抽出液に HCl を加えて酸性とすると定量的に沈殿を生ずる. 中央より陽極側へ 3~4 cm の部分から得られたものを取り, 沈殿を生じさせて遠心分離後, 吸引濾過し, 繰り返し水洗して酸性を除き減圧乾燥し, 黒褐色粉末 60 mg を得 (FA).

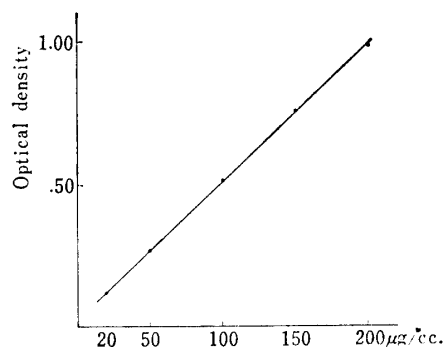


Fig. 10.
Optical Density of FB-Water
Solution at $430 \text{ m}\mu$

FA 50 mg に NH_3 飽和 MeOH 10 倍量を加え, NH_3 を導通しながら, 水数滴を加え, 振盪して完全に溶解させ, 暫時放置後, 常温で減圧濃縮乾燥して, 褐色粉末 31 mg を得 (FB).

FB の元素分析実測値は C 55.85, H 5.50, N 6.50, S 3.30, 分子量測定結果 (秋谷改良 Barger 法) 2070 で, これより FB の分子式として $\text{C}_{96}\text{H}_{110}\text{O}_{36}\text{N}_{10}\text{S}_2$ を推定した. その場合の理論値は C 56.43, H 5.39, N 6.85, S 3.14 で 分子量=2042 である.

FA の分析実測値 C 57.99, H 5.12, N 5.75, S 3.27. この結果と FB の分子式より FA の分子式として $\text{C}_{96}\text{H}_{104}\text{O}_{36}\text{N}_8\text{S}_2$ を推定した. その場合の理論値 C 57.44, H 5.17, N 5.58, S 3.19 である.

沝紙電気泳動 東洋沝紙 No. 51, 12×36 cm を使用, pH 8, $\mu=0.05$ の磷酸緩衝液を溶媒として陰極から 12 cm を原点, 定電流 0.4 mA/cm, 2 hr 泳動して, 陽極側に 9 cm 移動したスポットを認めた. 沝紙を乾燥後, 80% H_2SO_4 を spray して呈色させた.

昇華分解成績体 FB 0.5 g を 4 mm の減圧下で 400° 以上まで加熱し得られた昇華物をベンゼンで熱時抽出し, 抽出液を減圧濃縮乾固後ベンゼンから再結晶の淡黄色針晶 50 mg を得た. さらはベンゼンから再結晶を繰り返して得られた結晶はアントラキノンと混融して mp(decomp) 降下を認めず, 分析値は C 80.47%, H 3.72% であつた.

FB の酸分解とペーパークロマトグラフィー 50 mg に 8N HCl 0.5 ml を加え封管に入れ, 沸騰水浴中 20 hr 加熱後, 不溶物を吸引濾過し, 水洗して沝液と洗液を合して減圧濃縮乾固し, さらにアルコールを加えて繰り返し減圧濃縮乾固して HCl を除去し, 残留物を少量水に溶解し検液としてペーパークロマトグラフィーを行なつた. 使用沝紙は東洋沝紙 No. 51, 展開溶媒は $\text{BuOH} \cdot \text{AcOH} \cdot \text{H}_2\text{O} (4:1:5)$ の上層, 下端から 5 cm を原点として上昇法により, 原点から 30 cm 展開, ニンヒドリン陽性物質として原点付近の数個のスポットと共に Rf 0.70 のスポットを検出した. トリプトファン (HCl 処理) は 0.58, トリプタミン (HCl 処理) は 0.54 である.

トリプタミン使用時の反応成績体 トリプタミン·HCl, グルコース, アンスロン各 0.5 g を用いて, トリプトファン使用時と同様に処理し CHCl_3 抽出後に淡褐色粉末 0.43 g を得, これに NH_3 飽和 MeOH 5 ml を加え一昼夜放置後引吸過し, 沝紙上の残留物を MeOH 洗つて乾燥し淡褐色粉末 0.4 g を得た. Anal. Found C 56.11, H 6.24, N 8.03, S 4.87,

本研究に当り, 友田正司助教授はじめ神谷智子, 中条恒子, 大塚節子各助手の絶大なる御援助をいただきましたことを感謝いたします。

Summary

It was reported in the previous paper that of the various amines examined for their effect on the anthrone reaction of sugars none except tryptophan had any effect. In the present series of experiment, several substances having structure similar to tryptophan were examined for their effect on the anthrone reaction. Coloration from the reaction between sugar and anthrone was examined in the presence of tryptophan and of other substances, and the color was found to be entirely different. The pigment assumed to have been formed by the reaction of a sugar and anthrone, that pigment added with tryptophan, and a pigment formed in the presence of all these three were found to be all different. The color formed in the presence of these three substances at the same time must be a characteristic pigment and its isolation and purification were attempted. The substances thereby isolated was submitted to elemental analysis, molecular weight determination, and examination of properties. A molecular formula was proposed and some considerations were made on its structure.

フェナンスレンキノンとアミン類との反応 第 I 報

ジフェン酸とベンジルアミンとの反応

多田 敬三, 菊池 典子, 河野 通子

The reaction of Phenanthrenequinone with amines. Part I.

The reaction of diphenic acid with benzylamine.

Keizo TADA, Noriko KIKUCHI, Michiko KONO

Heiderberger 等¹⁾ ラベルした dibenz[a, h]anthracene [I] を mice に塗布し, 蛋白質結合物質を単離し更に下の機構図の [II], [III] の酸アミドを掴まえ, 発癌性炭化水素が “K-Region” で蛋白質に結合することを証明するとともに下の反応機構を推定した.

この中で [I] が H_2N-R と結合する (様式) が問題である. 石館, 多田はかねてからこれ等の発癌性炭化水素類の発癌機構を論ずる際, “K-Region” がオルトキノイド型になると仮定しておつたが, 上式も一つの可能性を示唆するものであつた. しかし II, III となるためには必ずしもキノイド型をつくる必要はなく, “K-Region” をつくる c-c 結合が先に酸化開裂してジカルボン酸となつてからアミンと反応してアミド結合を生じてもよいわけであり, その何れかを決める事は非常に興味ある問題である. 多田等は, この研究の基礎的なものとして, [I] のオルトキノンの代わりに phenanthrene-9, 10-quinone [IV] を, また上述のジカルボン酸の代わりに diphenic acid [V] を用い, アミンとしては脂肪族第 1 アミンでありかつ強塩基性の benzylamine [VI] を用いて反応させその生成物および反応過程を研究している. [IV] と [VI] との反応についてはかなりの知見を得たが更に研究を要する段階にあり, 一方 [V] と [VI] との反応につ