可視部吸収スペクトルによる Voges-Proskauer 反応の研究

坂口 武一， 田辺 信三， 野中 浦雄*

(1970 年 7 月 6 日受理)

O'Meara 法と Eggleton 法の反応の違いを吸収スペクトルで調べた結果、O'Meara 法はアルカリ濃度に左右され、Eggleton 法は α -ナフトール濃度に左右されることがわかった。

O'Meara 法で弱アルカリ中では $405\text{ m}\mu$ と $500\text{ m}\mu$ 領域に $\lambda_{\max}$ があり、強アルカリ中では $500\text{ m}\mu$ 領域のみに吸収があった。一方 Eggleton 法も $500\text{ m}\mu$ 領域のみに $\lambda_{\max}$ があり、O'Meara 法の反応性は強アルカリのほうが高く、弱アルカリ中では呈色物質はすみやかに分解される。また感度は Eggleton 法のほうが高く、ジアセチルを $0.01\text{ }\mu\text{ mol/ml}$ 、O'Meara 法は $0.1\text{ }\mu\text{ mol/ml}$ 定量できる。そして両法による色素は、構造および性質が違うことが推定された。

1 緒 言

Voges-Proskauer 反応¹⁾(V-P 反応)に関して Eggleton²⁾ はジアセチル、クレアチンを用いる O'Meara 法³⁾ とジアセチル、クレアチン、 α -ナフトールを用いる Barritt 法⁴⁾ とをワールブルグ法を用いて検討し、両法とも反応過程で酸素を取り込む作用があることを報告した。そして特に Barritt 法については、けん氣的条件下では呈色せず、好氣的条件で呈色することを明らかにした。したがって V-P 反応においては酸素が必要で、アルカリ溶液中のジアセチルと α -ナフトールが酸化の触媒を行ない、特に α -ナフトールの役割は大きい。

しかしながら V-P 反応色素については粗物質について pH と色の報告⁵⁾ はあるが分離精製は行なわれていない。最近新島ら⁶⁾ は坂口反応と V-P 反応の比較でペーパークロマトグラフィーによって V-P 反応色素を分離しているが、いまだ呈色物質の構造、機構については検討していない。

また、O'Meara 法に準じたジアセチルとグアニジン類の呈色物質の構造研究も検討されていない。

ただ、シクロヘキサジオンとアルギニンの希アルカリ溶液でイミダゾール誘導体⁷⁾ が得られ、またフェナントレンキノンの一置換グアニジンよりけい光物質を得たりあるいは、フェニルグリオキザール⁸⁾ とアルギニンでイミダゾール誘導体をつくった報告や、アミノ基を用いて弱アルカリ溶液中でイミダゾール誘導体をつくった報告⁹⁾ は二、三見られる。

しかし、これらの縮合反応は赤色を呈する V-P 反応

の機構の説明にはただちに利用することはできない。

著者らは既報¹⁰⁾ で、V-P 反応のジアセチル、 α -ナフトール系に対する反応物質の限界について研究し、遊離のアミノ基を有するグアニジン化合物のみが、V-P 反応陽性を示し、そのなかでも *N,N*-ジアルキル置換グアニジン化合物が最もよい感度を示すことを報告した。

今回は、V-P 反応のジアセチル、グアニジン化合物、 α -ナフトール系による反応機構解明の一環として、グアニジン化合物として、*N,N*-ジアルキル置換グアニジン誘導体 (1,1-ジメチルグアニジン、1,1-ペンタメチレングアニジン、クレアチン) を中心に、O'Meara 法と Barritt 法 (以後 Eggleton がこれを改良したので Eggleton 法に統一する) による呈色の差異を可視部吸収スペクトルで比較し、最もよい反応条件を見いだすとともに反応機構の解明に対するいくつかの知見を得たので報告する。

2 装置および試薬

2.1 装 置

可視部吸収スペクトルの測定には日立自記分光光度計 EPS-3T 型を使い、各極大波長による吸光度の測定には日立 101 型分光光度計 (1cm のガラスセルを使用) を使用した。

2.2 試 薬

クレアチン、ジアセチル、 α -ナフトールはそれぞれ試薬特級を使い、特にジアセチルは特級品を蒸留して使用した。

6% stock alkali 溶液：試薬特級の水酸化ナトリウム 30g と試薬特級の炭酸ナトリウム 80g を水で溶かし、

* 千葉大学薬学部薬品分析化学教室：千葉市弥生町

全量を 500 ml とする。

40% 水酸化ナトリウム溶液：試薬特級の水酸化ナトリウム 80 g を水で溶かし、全量を 200 ml とする。

α -ナフトールアルカリ溶液：各濃度になるように α -ナフトールを量り、stock alkali 溶液に溶かして調製、用時調製する。

0.05% (5.8 μ mol/ml) ジアセチル水溶液：1% ジアセチル水溶液を 20 倍に希釈して使用した。

10 μ mol/ml ジアセチル水溶液。

1,1-ジメチルグアニジン硫酸塩：既報¹⁰⁾に従って合成した。mp 291°C¹¹⁾ (decomp)。

1,1-ペンタメチレングアニジン硫酸塩：既報¹⁰⁾に従って合成した。mp 286°C¹²⁾ (decomp)。

10 μ mol/ml *N,N*-ジ置換グアニジン類の水溶液。

3 実験法

3.1 O'Meara 法

3.1.1 濃厚アルカリ溶液中での反応 各 10 μ mol/ml の *N,N*-ジ置換グアニジン類水溶液 0.2 ml を試験管にとり、この中に 10 μ mol/ml のジアセチル水溶液 0.4 ml をとる。次に 40% 水酸化ナトリウム溶液 7 ml を加える。水を加えて全量 10 ml として 10 分後に水をブランクとして吸収曲線を測定する。

3.1.2 希薄アルカリ溶液中での反応 各 10 μ mol/ml の *N,N*-ジ置換グアニジン類水溶液 0.4 ml を試験管にとり、この中に 10 μ mol/ml のジアセチル水溶液 0.8 ml を加える。次に 6% stock alkali 溶液 2 ml を加える。水で全量 10 ml とする。10 分後に水をブランクとして吸収曲線を測定する。

3.2 Eggleton 法

各 10 μ mol/ml の *N,N*-ジ置換グアニジン類の水溶液を 10 倍に希釈し、この 0.5 ml と、0.05% (5.8 μ mol/ml) ジアセチル水溶液 1 ml を加える。次に 1% α -ナフトール 6% stock alkali 溶液 2 ml 加え、水で全量 10 ml とする。30 分後に α -ナフトールの試薬ブランクを用いて吸収曲線を測定する。

4 結果および考察

4.1 Eggleton 法, O'Meara 法による呈色溶液の吸収スペクトルによる比較

Fig. 1-a より Eggleton 法ではクレアチン、1,1-ジメチルグアニジン、1,1-ペンタメチレングアニジンとも 535 $m\mu$ に極大波長を示したが、O'Meara 法においては濃厚アルカリ溶液中 (28% 水酸化ナトリウム溶液)、クレアチンが 520 $m\mu$ 、1,1-ジメチルグアニジン、1,1-ペンタメチレングアニジンの両者が 515 $m\mu$ に極大波長をも

ち紅色を呈した。しかし希薄アルカリ溶液中 (Eggleton 法と比較するために同濃度の 6% stock alkali 溶液を使用) では、クレアチンが 510 $m\mu$ に極大波長を示し、他の二つは同じ 515 $m\mu$ に極大波長を示し、その他に 3 者とも共通に 405 $m\mu$ に顕著な吸収を示した。そして色は赤とう色を呈した (Fig. 1-b, 1-c)。

呈色強度は Eggleton 法のほうが O'Meara 法に比べ Fig. 1 の条件では 4~20 倍感度が高く、また O'Meara

Fig. 1-a Absorption spectra of V-P reaction by Eggleton's method

— Creatine; ---- 1,1-Dimethyl guanidine; - · - 1,1-Pentamethylene guanidine; Concentration—1 μ mol/ml guanidino compounds: 0.5 ml, 5.8 μ mol/ml (0.05%) diacetyl: 1.0 ml, 1% α -naphthol stock alkaline soln. (6%): 2.0 ml, total 10 ml with water; Measured after 30 min against the reagent blank

Fig. 1-b Absorption spectra of V-P reaction by O'Meara's method

— Creatine; ---- 1,1-Dimethyl guanidine; - · - 1,1-Pentamethylene guanidine; Concentration—10 μ mol/ml guanidino compounds: 0.2 ml, 10 μ mol/ml diacetyl: 0.2 ml, 40% NaOH: 7 ml, total 10 ml with water; Measured after 10 min against water

Fig. 1-c Absorption spectra of V-P reaction by O'Meara's method

— Creatine; ---- 1,1-Dimethyl guanidine; - · - 1,1-Pentamethylene guanidine; Concentration— 10μ mol/ml guanidino compounds: 0.4 ml, 10μ mol/ml diacetyl: 0.8 ml, 6% stock alkaline soln.: 2.0 ml, total 10 ml with water; Measured after 10 min against water

法だけでは濃厚アルカリ溶液中のほうが希薄アルカリ溶液中に比べて約 1.5~7 倍感度が高い。極大波長は Eggleton 法のほうが 15~20 $m\mu$ 長波長側にシフトしている。

さて O'Meara 法の希薄アルカリ溶液中で得られる 405 $m\mu$ の吸収はジアセチルのみの水溶液または希薄アルカリ溶液中の 405 $m\mu$ の吸収¹³⁾¹⁴⁾と異なる物質に基づくものであることが次の吸光度の時間的変化から証明された。

4.2 O'Meara 法による 405 $m\mu$ における反応時間に対する吸光度の変化

Fig. 2-a に示したように、ジアセチルの希薄アルカリ溶液中で 405 $m\mu$ に極大波長を示す。しかし Fig. 1-b で示したように濃厚アルカリ溶液中での O'Meara 法では 405 $m\mu$ に極大吸収を示さない。この結果はジアセチル自身の濃厚アルカリ溶液中での反応でも同様の結果を示し、Fig. 1-b の条件での濃度では 405 $m\mu$ の吸収は 0 であった。しかし希薄アルカリ溶液中では Fig. 2-b に示したように時間とともに漸次 405 $m\mu$ の吸光度が増大していき、80 分たっても反応は進んでいる。そして反応は濃度に比例して起こっていくことがわかる。それに対して希薄アルカリ溶液中での O'Meara 法による 405 $m\mu$ の吸光度は Fig. 3(b), 4(b), 5(b) に示したように、反応直後のはじめの吸光度が最も高く、20 分後には急激に下がり、それ以後吸光度は漸次減少する。この 405 $m\mu$ の吸光度は 3 者のグアニジン類によって違い、Fig.

Fig. 2-a Absorption spectrum of diacetyl in the alkaline medium

Concentration— 10μ mol/ml diacetyl: 1.6 ml, 6% stock alkaline soln.: 2 ml, total 10 ml with water; Measured after 30 min against water

Fig. 2-b Effect of standing time of diacetyl in the alkaline medium on absorbance at 405 $m\mu$

Concentration: 10μ mol/ml diacetyl, 1: 0.2 ml, 2: 0.4 ml, 3: 0.8 ml, 4: 1.6 ml, 6% stock alkaline soln.: 2 ml, total 10 ml with water; Reference: Water

3(a), 4(a), 5(a) に示した 500 $m\mu$ 領域の極大波長で最も高い吸光度を示した 1,1-ペンタメチレンジアニジン (Fig. 3) が最も高く、次にクレアチン (Fig. 5), 1,1-ジメチルグアニジン (Fig. 4) の順になっている。

また、Fig. 2-b のジアセチルと対応する Fig. 3(b), 4(b), 5(b) の O'Meara 法の 405 $m\mu$ の吸光度を比較すると、3 者ともジアセチルのみのはじめの吸光度より高

Fig. 3 Effect of standing time on absorbance at $\lambda_{\max}$ by O'Meara's method (1,1-Pentamethylene guanidine)

Concentration— $10 \mu\text{mol/ml}$ 1,1-pentamethylene guanidine : 0.4 ml , $10 \mu\text{mol/ml}$ diacetyl 1 : 0.2 ml , 2 : 0.4 ml , 3 : 0.8 ml , 4 : 1.6 ml , 6% stock alkaline soln. : 2 ml , total 10 ml with water; Reference : Water

Fig. 4 Effect of standing time on absorbance at $\lambda_{\max}$ by O'Meara's method (1,1-Dimethyl guanidine)

Concentration— $10 \mu\text{mol/ml}$ 1,1-dimethyl guanidine : 0.4 ml , $10 \mu\text{mol/ml}$ diacetyl 1 : 0.2 ml , 2 : 0.4 ml , 3 : 0.8 ml , 4 : 1.6 ml , 6% stock alkaline soln. : 2 ml , total 10 ml with water; Reference : Water

く、20 分以後では、60 分からジアセチルの示す吸光度のほうが高くなっていく。この O'Meara 法による $405 \text{ m}\mu$ の時間による吸光度変化は $500 \text{ m}\mu$ 領域の極大波長における吸光度の変化と同じ傾向を示している。このことから $405 \text{ m}\mu$ に吸収を示す物質は、グアニジン類自身アルカリ性で $405 \text{ m}\mu$ に吸収を示さないことから、ジアセチルで考えられている dimer および trimer のかっ色〜だいたい色の *p*-xyloquinone 類^{13)~17)}ではなくて、アルカリ性でジアセチルとグアニジン化合物の縮合物が主体であろうと推定される。そして $405 \text{ m}\mu$ を示す化合

Fig. 5 Effect of standing time on absorbance at $\lambda_{\max}$ by O'Meara's method (Creatine)

Concentration— $10 \mu\text{mol/ml}$ creatine : 0.4 ml , $10 \mu\text{mol/ml}$ diacetyl 1 : 0.2 ml , 2 : 0.4 ml , 3 : 0.8 ml , 4 : 1.6 ml , 6% stock alkaline soln. : 2 ml , total 10 ml with water; Reference : Water

物は $500 \text{ m}\mu$ 領域を示す化合物と同一で、希薄アルカリ溶液中では反応性が乏しいが、短時間でグアニジン類と反応して、同時に過剰の未反応ジアセチル中ですみやかに分解が起こり退色していく。しかしアルカリ濃度が高くなると反応が促進されて、かつ希薄アルカリ溶液中でできた色素が一部構造変化を受ける。また α -ナフトールのはいった Eggleton 法で生成する色素は同じアルカリ濃度でも $405 \text{ m}\mu$ に吸収を示さず、 $500 \text{ m}\mu$ 領域における極大波長が $15 \sim 20 \text{ m}\mu$ と大きく違っていることから O'Meara 法でできる色素とは異なった構造をとっていることが推測できる。

4.3 O'Meara 法によるアルカリの影響

Fig. 1-b, 1-c より O'Meara 法はアルカリの濃度によって反応が影響されると考えられたので、次の処方でアルカリの影響を調べてみた。

$10 \mu\text{mol/ml}$ の *N,N*-置換 グアニジン 類の水溶液 各 0.2 ml と $10 \mu\text{mol/ml}$ のジアセチル水溶液 0.4 ml を試験管にとり、40% 水酸化ナトリウム溶液を 1, 2, 4, 6, 8 ml と 5 段階の濃度溶液をつくり、水で全量 10 ml とする。

これによってアルカリ濃度がそれぞれ 4, 8, 16, 24, 32% の溶液ができる。そして 10 分後と 60 分後に吸収曲線をとる。

これによってアルカリ濃度による $500 \text{ m}\mu$ 領域における吸光度の変化を Fig. 6 に示す。

実際に吸収曲線をとると各アルカリ濃度によって多少の極大波長のずれを生じた。すなわちクレアチンでは、

Fig. 6 Effect of concentration of NaOH in O'Meara's method

— Creatine; ---- 1,1-Dimethyl guanidine;
 ---- 1,1-Pentamethylene guanidine; Concentra-
 tion— $10 \mu\text{mol/ml}$ guanidino compounds : 0.2 ml ,
 $10 \mu\text{mol/ml}$ diacetyl : 0.4 ml , NaOH, total 10 ml with
 water; — Measured at $520 \text{ m}\mu$; ----, — Measured at
 $515 \text{ m}\mu$; —●— Measured after 10 min;
 —○— Measured after 60 min; Reference : Water

10 分後 $510 \rightarrow 520 \rightarrow 520 \rightarrow 520 \rightarrow 520 \text{ m}\mu$, 60 分後 $520 \rightarrow 520 \rightarrow 525 \rightarrow 520 \rightarrow 520 \text{ m}\mu$, 1,1-ペンタメチレングアニジンでは, 10 分後 $500 \rightarrow 500 \rightarrow 510 \rightarrow 515 \rightarrow 520 \text{ m}\mu$, 60 分後 $515 \rightarrow 515 \rightarrow 515 \rightarrow 515 \rightarrow 525 \text{ m}\mu$, 1,1-ジメチルグアニジンでは, 10 分後 $515 \rightarrow 500 \rightarrow 515 \rightarrow 515 \rightarrow 515 \text{ m}\mu$, 60 分後 $500 \rightarrow 500 \rightarrow 515 \rightarrow 515 \rightarrow 515 \text{ m}\mu$ と $4 \rightarrow 8 \rightarrow 16 \rightarrow 24 \rightarrow 32\%$ のアルカリ濃度で変化する. しかし Fig. 6 ではクレアチン : $520 \text{ m}\mu$, 1,1-ペンタメチレングアニジン : $515 \text{ m}\mu$, 1,1-ジメチルグアニジン : $515 \text{ m}\mu$ で測定した結果を示した. 感度は 10 分後, 60 分後でもクレアチンが最もよく, 次に 1,1-ジメチルグアニジン, 最後が 1,1-ペンタメチレングアニジンであった. また, アルカリ濃度は $24 \sim 28\%$ が最もよく, 32% では下がる傾向にある. $4, 8\%$ の濃度ではほとんど吸収がみられなかった. この結果より, O'Meara 法は 28% アルカリ濃度になるように調製する. 16% 濃度のアルカリのとき, 3 者のグアニジン類とも 10 分後に比べ 60 分後の吸光度が下がっている. そしてこれらには共通して, 10 分後も 60 分後も $405 \text{ m}\mu$ の吸収がみられ, 60 分後のほうが吸光度が大きくなっている. しかし $500 \text{ m}\mu$ 領域の吸光度に比べて値は小さかった.

この結果より, O'Meara 法はアルカリ濃度が影響することがわかる. そこでこのアルカリ条件での O'Meara

Fig. 7 Effect of reaction time in O'Meara's method

Concentration—(a) $10 \mu\text{mol/ml}$ creatine : 0.2 ml ,
 $10 \mu\text{mol/ml}$ diacetyl : 0.4 ml , 40% NaOH : 7 ml ,
 total 10 ml with water; (b) $10 \mu\text{mol/ml}$ 1,1-dimethyl
 guanidine : 0.2 ml , $10 \mu\text{mol/ml}$ diacetyl : 0.4 ml , 40%
 NaOH : 7 ml , total 10 ml with water; (c) $10 \mu\text{mol/ml}$
 1,1-pentamethylene guanidine : 0.2 ml , $10 \mu\text{mol/ml}$
 diacetyl : 0.4 ml , 40% NaOH : 7 ml , total 10 ml
 with water; (d) $10 \mu\text{mol/ml}$ creatine : 2 ml , $10 \mu\text{mol/ml}$
 diacetyl : 0.2 ml , 40% NaOH : 7 ml , total 10 ml
 with water; (a), (d) Measured at $520 \text{ m}\mu$; (b), (c)
 Measured at $515 \text{ m}\mu$; Reference : Water

法の反応時間に対する吸光度の変化を Fig. 7 に示した.

この結果より, クレアチン, 1,1-ペンタメチレングアニジン, 1,1-ジメチルグアニジンとも 90 分で安定することがわかったので, O'Meara 法は 90 分間反応させたのちに比色することにする.

4.4 O'Meara 法と Eggleton 法によるジアセチルの影響

O'Meara 法の場合にはジアセチル水溶液 ($10 \mu\text{mol/ml}$) を最終濃度が $0.2, 0.4, 0.6 \mu\text{mol/ml}$ になるように 3 段階にとり, $10 \mu\text{mol/ml}$ の各 N,N -置換グアニジン類を 0.2 ml と一定にして, 40% 水酸化ナトリウム溶液 7 ml 加え, 水で全量 10 ml とし, おのおの $520, 515, 515 \text{ m}\mu$ における吸光度を 90 分後に測定する.

Eggleton 法の場合は, 各 N,N -置換グアニジン類の最終濃度を $0.025 \mu\text{mol/ml}$ と一定にしておき, ジアセチルの最終濃度を $0.025, 0.05, 0.1, 0.25 \mu\text{mol/ml}$ の 4 段階までとり, 1% α -ナフトール stock alkali 溶液 2 ml 加え, 水で全量 10 ml とし, 30 分後に $535 \text{ m}\mu$ における吸光度を測る.

こうして得た O'Meara 法と Eggleton 法におけるジアセチルの影響を Fig. 8(a), 8(b) に示す.

Fig. 8(a) の Eggleton 法, Fig. 8(b) の O'Meara

Fig. 8 Effect of concentration of diacetyl

— Creatine; ---- 1,1-Dimethyl guanidine;
 - · - · 1,1-Pentamethylene guanidine; (a) Eggleton's method, concentration—0.5 $\mu\text{mol/ml}$ guanidino compounds : 0.5 ml, 1% α -naphthol stock alkaline soln. (6%) : 2.0 ml, diacetyl, total 10 ml with water, measured after 30 min at 535 $m\mu$ against the reagent blank; (b) O'Meara's method, concentration—10 $\mu\text{mol/ml}$ guanidino compounds : 0.2 ml, diacetyl, 40% alkaline soln. (NaOH) : 7 ml, total 10 ml with water, measured after 90 min at each λ_{max} against water

法とも、グアニジン類とジアセチルのモル比が 1 : 2 のとき最大の吸光度を与え、それ以上ジアセチルの濃度を高めても呈色強度にはほとんど影響を与えない。この結果はさらに Fig. 3(a)~5(a) で示した希薄アルカリ溶液中での反応でもだいたい同様の結果を与えている。

4.5 Eggleton 法による α -ナフトールの影響

N,N-置換 グアニジン類の 0.25 $\mu\text{mol/ml}$ 水溶液 1 ml, 0.05% (5.8 $\mu\text{mol/ml}$) ジアセチル水溶液 1 ml をおのおの加え, 0.5~5% α -ナフトール stock alkali 溶液 2 ml をおのおの加え, 水で全量 10 ml とし, 30

分後に 535 $m\mu$ に対する吸光度を測定する。

アルカリ濃度は Eggleton 一般法 3.2 に従い, α -ナフトールが反応にどれだけ関与しているかを Fig. 9 に示した。

Fig. 9 Effect of concentration of α -naphthol in Eggleton's method

— Creatine; ---- 1,1-Dimethyl guanidine;
 - · - · 1,1-Pentamethylene guanidine; Concentration—1 $\mu\text{mol/ml}$ guanidino compounds : 0.25 ml, 0.05% (5.8 $\mu\text{mol/ml}$) diacetyl : 1 ml, α -naphthol stock alkaline soln. : 2 ml, total 10 ml with water; Measured after 30 min at 535 $m\mu$ against the reagent blank

Fig. 9 より, 今までのナフトール 1% 濃度よりも 3% 濃度のほうが約 1.3~1.5 倍感度が上がることを示している。

そして 1% 以下では呈色がずっと弱まる。またグアニジン類およびジアセチルの濃度に比べて, α -ナフトールは 70~140 倍も濃度が高い。この結果は Eggleton 法が α -ナフトールに依存していることを示す。

4.6 O'Meara 法と Eggleton 法によるクレアチン, ジアセチルの検量線の比較

4.1~4.5 の結果より, O'Meara 法ではグアニジン物質としてはクレアチンが最もよい結果を示し, アルカリ濃度も 28% が最もよい結果を与えた。また, Eggleton 法では, 既報より 1,1-ペンタメチレンジアミンがこの 3 者のうちで最もよい結果を与えている¹⁰⁾。そして 4.5 で得られた 3% α -ナフトールを使って, 両方法でのジアセチル, クレアチンの検量線の検討を行なってみた。O'Meara 法によるクレアチンおよびジアセチルの

時間による影響は Fig. 7 に示してあり, 両物質とも吸光度がだいたい 90 分で一定になる. Eggleton 法で 1,1-ペンタメチレンジアニジンおよびクレアチンを試薬に用いて, ジアセチルの反応を追ってみると, 1% ナフトールアルカリ液, 3% ナフトールアルカリ液でも時間とともに一定になって退色していく傾向にある. そこで 30 分後を比色する時間とした (Fig. 10).

Fig. 10 Effect of reaction time in Eggleton's method

Concentration—(a) $10 \mu\text{mol/ml}$ 1,1-pentamethylene guanidine : 1 ml , $10 \mu\text{mol/ml}$ diacetyl : 0.3 ml , 3% α -naphthol stock alkaline soln. : 2 ml , total 10 ml with water; (b) $10 \mu\text{mol/ml}$ 1,1-pentamethylene guanidine : 1 ml , $10 \mu\text{mol/ml}$ diacetyl : 0.3 ml , 1% α -naphthol stock alkaline soln. : 2 ml , total 10 ml with water; (c) Saturated creatine soln. : 1 ml , $10 \mu\text{mol/ml}$ diacetyl : 0.3 ml , 3% α -naphthol stock alkaline soln. : 2 ml , total 10 ml with water; Measured at $535 \text{ m}\mu$ against the reagent blank

次に O'Meara 法によるクレアチン濃度, Eggleton 法による 1,1-ペンタメチレンジアニジン濃度の影響を調べてみた. その結果を Fig. 11 に示す.

Fig. 11 の O'Meara 法で飽和クレアチンを 1 ml 使った場合最終濃度 $0.2 \mu\text{mol/ml}$ のジアセチルでは 1 時間以内に退色した. しかし最終濃度が $2 \mu\text{mol/ml}$ のクレアチン水溶液のとき最高の感度を示した. Eggleton 法では最終濃度が $0.2 \sim 3 \mu\text{mol/ml}$ の 1,1-ペンタメチレンジアニジン水溶液で値に大きな変動がみられなかった. またグアニジン物質はアルカリ溶液中およびアルカリ溶液中 α -ナフトールの存在下でも何も変化が起らなかったのので, 次の処方でジアセチルの検量線を作成した.

O'Meara 法: $10 \mu\text{mol/ml}$ クレアチン水溶液 2 ml , 各種濃度のジアセチルおよび 40% 水酸化ナトリウム溶

Fig. 11 Effect of amount of creatine and 1,1-pentamethylene guanidine

(a) O'Meara's method, concentration— $10 \mu\text{mol/ml}$ diacetyl : 0.2 ml , creatine, 40% NaOH : 7 ml , total 10 ml with water, measured after 90 min at $520 \text{ m}\mu$ against water; (b) Eggleton's method, concentration— $1 \mu\text{mol/ml}$ diacetyl : 0.25 ml , 1,1-pentamethylene guanidine, 3% α -naphthol stock alkaline soln. : 2 ml , total 10 ml with water, measured after 30 min at $535 \text{ m}\mu$ against the reagent blank

Fig. 12 Calibration curves for diacetyl and creatine

(a), (b), (c) Eggleton's method; (d), (e) O'Meara's method; Reagents—(a) 3% α -naphthol alkaline soln. contained $1 \mu\text{mol/ml}$ 1,1-pentamethylene guanidine : 2 ml , total 10 ml with water; (b) 1% α -naphthol alkaline soln. contained $1 \mu\text{mol/ml}$ 1,1-pentamethylene guanidine 2 ml , total 10 ml with water; (c) 1% α -naphthol : 2 ml , saturated creatine soln. : 1 ml , total 10 ml with water; (d) $10 \mu\text{mol/ml}$ creatine : 1 ml , 40% NaOH : 7 ml , total 10 ml with water; (e) $10 \mu\text{mol/ml}$ diacetyl : 0.4 ml , 40% NaOH : 7 ml , total 10 ml with water; (a)~(c) Measured after 30 min against the reagent blank; (d), (e) Measured after 90 min against water

液 7 ml, 全量の水で 10 ml とし 90 分後に比色する.

Eggleton 法 : 3% α -ナフトールの 1 μ mol/ml 1,1-ペンタメチレンジアニジン含有の stock alkali 溶液 2 ml, 各種濃度のジアセチルを加え, 水を加えて全量 10 ml とし, 30 分後に比色する. これらの方法によって得られた検量線を Fig. 12 (a), (d) に示す.

比較の意味で Eggleton 法では 1% α -ナフトール stock alkali 溶液中での 1 μ mol/ml の 1,1-ペンタメチレンジアニジンと飽和クレアチンによるジアセチルの検量線を示した {Fig. 12 (b), (c)}. また O'Meara 法では Fig. 8(b) の条件に従ってジアセチルによるクレアチンの検量線を Fig. 12(e) に示した.

Fig. 12 の結果より, Eggleton 法では最終濃度が 0.01 μ mol/ml のジアセチルがベールの法則に従って定量されるが, O'Meara 法では 0.1 μ mol/ml までのジアセチルが定量され, 感度は, Eggleton 法のほうが 10 倍高いことがわかる, そして O'Meara 法では Fig. 12(e) に示したようにクレアチンのジアセチルによる定量のほうが 0.07 μ mol/ml まで定量されることがわかった. そして Eggleton 法で今まで使われている飽和クレアチンを試薬に使う反応 {Fig. 12(c)} より 1,1-ペンタメチレンジアニジン含有の 3% α -ナフトール溶液を使ったほうがわずかではあるが感度が増大した.

文 献

- 1) O. Voges, B. Proskauer : *Z. Hyg. Infektionskrankh.*, **28**, 20 (1898).
- 2) P. Eggleton, S. R. Elsdon, N. Gaugh : *Biochem. J.*, **37**, 526 (1943).
- 3) R. A. Q. O'Meara : *J. Pathol. Bacteriol.*, **34**, 401 (1931).
- 4) M. M. Barritt : *ibid.*, **42**, 441 (1936).
- 5) 新島邦広, 奥山典生 : *生化学*, **35**, 396 (1963).
- 6) K. Toi, E. Bynum, E. Norris, H. A. Itano : *J. Biol. Chem.*, **242**, 1036 (1967).
- 7) S. Yamada, H. Itano : *Biochim. Biophys. Acta*, **130**, 538 (1966).
- 8) K. Takahashi : *J. Biol. Chem.*, **243**, 6171 (1968).
- 9) J. W. Cornforth, H. T. Huang : *J. Chem. Soc. (London)*, **1948**, 731.
- 10) T. Nishimura, S. Tanabe, H. Toku, T. Kono, Y. Sakabe, T. Sakaguchi : *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, **17**, 639 (1969).
- 11) R. Phillips, H. T. Clarke : *J. Am. Chem. Soc.*,

45, 1775 (1923).

- 12) W. F. Cockburn, R. A. B. Bannard : *Can. J. Chem.*, **35**, 1285 (1957); *Chem. Abstr.*, **52**, 10076 (1958).
- 13) V. Pechmann : *Ber.*, **21**, 1415 (1888).
- 14) G. Machell : *J. Chem. Soc. (London)*, **1960**, 683.
- 15) R. Shapiro, J. Hachmann, R. Wahl : *J. Org. Chem.*, **31**, 271 (1966).
- 16) R. M. Cresswell, W. R. D. Smith, H. C. S. Wood : *J. Chem. Soc. (London)*, **1961**, 4882.
- 17) J. A. Yankee, Jr., C. D. Mitchell, T. H. Crawford : *J. Am. Chem. Soc.*, **90**, 1664 (1968).

☆

Study on the Voges-Proskauer reaction by visible absorption spectra. Takeichi SAKAGUCHI, Shinzo TANABE and Urao NONAKA (Division of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Chiba, Yayoi-cho, Chiba-shi)

Comparison of Voges-Proskauer reaction between the colored solution with diacetyl-guanidino compounds system (O'Meara's method) and diacetyl-guanidino compounds- α -naphthol system (Eggleton's method) were studied by visible absorption spectra, using such guanidino compounds as creatine, 1,1-dimethylguanidine and 1,1-pentamethyleneguanidine.

O'Meara's method was performed in the concentrated alkaline solution or in the similar diluted alkaline solution as in Eggleton's method.

And following results were obtained;

(1) We found absorption maxima of the colored solution by O'Meara's method of three guanidino compounds to have 520, 515 and 515 $m\mu$, respectively.

And the same peak of 405 $m\mu$ was commonly observed in the diluted alkaline solution by O'Meara's method with each guanidino compounds, besides the range of 500 $m\mu$.

(2) Color intensities of the colored solutions at 405 $m\mu$ and 500 $m\mu$ region by O'Meara's method were dependent on the concentration of alkali.

(3) By Eggleton's method, however, color intensities were dependent on the concentration of α -naphthol.

(4) In comparison of the colored solutions with absorption spectra and reaction processes, it was indicated that the colored substances by Eggleton's and O'Meara's method might be different from each other.

(5) The limit of colorimetric determination of diacetyl by V-P reaction were as follows.

Eggleton's method with 1,1-pentamethyleneguanidine was 0.01 μ mol/ml and O'Meara's method with creatine was 0.1 μ mol/ml.

(Received July 6, 1970)

☆

☆