[農化 第 37 卷, 第 12 号, p.738~742, 1963]

ストレプトマイシンの着色に関する研究 (第 2 報)*

ピンク系着色原因の究明 (その 2) と着色色素について

菅野能範, 若沢 正 (明治製菓株式会社川崎工場)

昭和 38 年 9 月 4 日 受 理

緒 言

ストレプトマイシン (SM) 水溶液および粉末の着色は, ピンクないしオレンジ色を呈する点の特徴であり, かつそれが製品の商品価値を著しく低下せしめることより問題となってきたが, この原因が何であるかは未だ解明されていない。著者らはこの原因物質として SM の分解物に着目し検討した結果, SM の加水分解生成物である Streptobiosamine (SB) が関与するものであろうことを推察し前報⁽¹⁾においてそれを報告した。今回さらに着色時における諸現象を検討しそれが Hodge⁽²⁾ らの提唱するいわゆるアミノ・カルボニル反応の特徴的現象と一致するものであることを認めた。また SM の着色物質が 4 種の色素よりなるものであり, かつそれが SM 分子中の SB 部分から生成することを確認したので以下に報告する。

実 験 方 法

I. 試料の調製

(1) SM 塩酸塩: メタノールから 3 回再結晶した SM 塩化カルシウム複塩を用い, さらに精製して塩酸塩とした。

(2) Methyl streptobiosaminide dimethyl acetal (SBA): N. G. Brink ら⁽³⁾の方法により調製した。すなわち無水の SM 塩酸塩を室温で 19 時間 methanolysis (1.1% の hydrogen chloride を含む) し, 溶媒を真空で除去後トルエン処理を行い粗 SBA を得る。さらにこの粗粉末をメタノールに溶解しエーテルを加えた後, アルミナの塔にかけメタノール・エーテル混合液で溶出し精製することにより純 SBA を得た。用いた純 SBA (以下単に SBA と記す) の特性の一例は次の如くである。

$[\alpha]_D^{20} = -142.9^\circ$ (文献値: $-143 \pm 2^\circ$) マルトール反応 (+), 坂口反応 (-)

また著者らの検討⁽⁴⁾したペーパー・クロマトグラフィー (PPC) により一点のみを与えた。

(3) マルトール: J. Fried ら⁽⁵⁾の方法により調製し m. p. 160° (文献値: $160 \sim 161^\circ$) の結晶を得た。坂口反応, アルカリ性硝酸銀反応共に陰性, マルトール反応は当然陽性である。

(4) ストレプチジン塩酸塩 (STD 塩酸塩): R. L. Peck ら⁽⁶⁾の方法に準じ, streptidine dipicrate より STD 塩酸塩の粗粉末を調製し, これをメタノールから 2 回再結晶せしめ, 結晶 STD 塩酸塩を調製した。

II. SBA および SM の塩酸加熱処理および呈色方法

(1) SBA: SBA 水溶液に塩酸を添加し特記しない限り沸騰浴中正確に 3 分間加熱し冷却する。この塩酸加熱処理液を 1 N NaOH で pH を 4 前後に調整し (この状態では試料溶液に未だ着色は認められず無色透明である), ついで再び沸騰浴中特記しないかぎり 3 分間加熱することにより呈色せしめた。なお, 本呈色条件による反応液の着色度は, 同一試料を 37° , 48 時間放置した場合の着色度にだいたい相当する。

(2) SM: SM 塩酸塩水溶液についての塩酸加熱処理および呈色法は前記 SBA と同様に行った。

III. STD の塩酸加熱処理 STD 塩酸塩の 2.5 mg/ml の水溶液 5 ml に 3 N HCl 1 ml 添加し沸騰浴中 10 分間加熱した。

IV. 着色度・pH の測定 反応液の着色度はコールマン Model 14 ユニバーサル分光光度計を用い, 510 mμ における吸光度で示した。pH はすべてガラス電極を用いて測定した。

V. 各種ガスの bubbling SM および SBA 塩酸加熱処理液をそれぞれ NaOH で pH 5.0 に調整後空気, 酸素, 窒素, 炭酸ガスでおのおの bubbling を行いながら, 65° , 15 分間加熱し呈色せしめた。なお窒素ガス,

* Studies on Coloration of Streptomycin. Part II. On the Cause of Reddening Coloration and Pigments in colored Solution of Streptomycin.

By Yoshinori SUGANO, Tadashi WAKAZAWA (Meiji Seika Kaisha, Ltd. Kawasaki Plant)

炭酸ガスの場合は 65° 加熱前におのおの室温で 5 分ないし 10 分 bubbling を行い, 溶存酸素をだいたい除去した後 (この操作によっても着色は認められない) 加熱呈色せしめた. また bubbling の程度は直径 5 mm のガラス管を用い, 3 ないし 5 bubbles/second である.

VI. 着色色素の PPC 前記 II (1) および (2) に準じ反応せしめた着色液 0.01 ないし 0.02 ml を東洋濾紙 No. 50 (2×40 cm) にスポットし *n*-ブタノール:ピリジン:水 (4:8:3) を展開剤として一次元下降法により 8 ないし 10 時間 27° で展開した.

実 験 結 果

I. 着色における諸現象

(1) SBA の塩酸加熱処理液の着色におよぼす窒素化合物の影響: SBA の塩酸加熱処理液に窒素化合物を等モル添加し, pH を 4 および 8 に調整後加熱呈色させた際の反応液の吸収曲線を第 1 図, 第 2 図に示した.

酸性側においては $\lambda_{\max}$ がいずれも 510 m μ であるのに対してアルカリ側における着色はいずれも $\lambda_{\max}$ が 480 m μ に移行する. このことは著者らが前報⁽¹⁾において報告したところの粗 SBA にもとづく着色が pH によ

ってその $\lambda_{\max}$ に移動を生じ, 酸性側で 500~510 m μ , アルカリ側で 480 m μ に $\lambda_{\max}$ を示した現象に一致するものであって, 添加した窒素化合物によっては $\lambda_{\max}$ に変化は生ぜず, ただ着色度のみ増加することを示すものである.

(2) 着色反応の進行に伴う pH の低下: SM 塩酸塩の塩酸加熱処理液について, NaOH で pH を 5.17 に調整後 5 分間まで加熱した際の結果は第 3 図の如くであり, 反応液のピンクの着色に伴い pH の急速な低下が認められた. なお SBA の塩酸加熱処理液の着色時においても同様な現象が認められた.

(3) 紫外部における吸収の発現: アミノ・カルボニル反応の中期にフルフラール類及びレダクトン類の中間体の生成が認められ, 紫外部に吸収を示すようになる⁽²⁾ので, SBA の塩酸加熱処理液の着色時についても検討した. 結果を第 4 図, 第 5 図に示す. SBA の塩酸加熱処理液の pH を 4 に調整し 100° で加熱することにより 305~310 m μ における吸収の発現をみた. この 305~310 m μ における吸光度は, 加熱時間の延長に伴い減少し逆に着色度の増加が認められた.

第 1 図 アルカリ性側 (pH 8) における着色の吸収曲線

〔註〕 control (SBA 塩酸加熱処理液)
 × — × グリシン添加
 ○ — ○ NH_4Cl 添加
 △ — △ *n*-ブチルアミン添加
 塩酸加熱処理時の SBA および HCl 濃度:
 SBA 4.2 mg/ml (0.08 N HCl 溶液)

第 2 図 酸性側 (pH 4) における着色の吸収曲線

〔註〕 第 1 図に同じ.

第 3 図 着色に伴う pH の低下

〔註〕 塩酸加熱処理時の SM および HCl 濃度:
 SM 45 mg 力価/ml (0.14 N HCl 溶液)

第 4 図 SBA および SBA の塩酸加熱処理液の紫外外部吸収曲線

〔註〕 塩酸加熱処理時の SBA および HCl 濃度：
SBA 4.2 mg/ml (0.02 N HCl 溶液)

第 5 図 SBA の塩酸加熱処理液の pH 4 における加熱時間に伴う紫外外部吸収曲線

〔註〕 ●—● 1 分間加熱 ×—× 5 分間加熱
○—○ 10 分間 △—△ 15 分間
塩酸加熱処理時の SBA および HCl 濃度：
SBA 4.2 mg/ml (0.02 N HCl 溶液)

第 1 表 SM および SBA の塩酸加熱処理液の着色におよぼす各種ガスの影響

		吸光度 ($\lambda=510 \text{ m}\mu$)	
		SM	SBA
Control		0.377	0.418
空	気	0.293	0.370
酸	素	0.301	0.180
炭	酸 ガ ス	0.102	0.210
窒	素 ガ ス	0.468	0.471

〔註〕

- (1) 塩酸加熱処理時の SM, SBA および HCl 濃度
(i) SM 45 mg 力価/ml (0.14 N HCl 溶液)
(ii) SBA 4.5 mg/ml (0.14 N HCl 溶液)
(2) 呈色時の pH 5.0

第 2 表 SBA 塩酸加熱処理液の着色におよぼす STD およびマルトールの影響

		吸光度 ($\lambda=510 \text{ m}\mu$)
Control (SBA 塩酸加熱処理液)		0.292
SBA 塩酸加熱処理液 + STD		0.298
" + STD 塩酸加熱処理液		0.280
" + マルトール		0.261

〔註〕

- (1) 濃度および塩酸加熱処理条件
(i) SBA (5mg/ml) 水溶液 5ml に 1N HCl 1ml 添加後加熱
(ii) マルトール (2.5 mg/ml) 水溶液 5ml 添加
(iii) STD (2.5 mg/ml) 水溶液 5ml 添加
(iv) STD 塩酸加熱処理液 5ml 添加
(2) 呈色時の pH 5.0

物である N-methyl-L-glucosamine の影響については今後検討を予定している。

II. 着色の色素成分について SM にもとづく着色色素と SBA にもとづく着色色素との異同をしらべるため、おのおのの PPC を行った。なお SM の製造工程中および製品の着色として問題になるのは酸性側におけるそれであるので、PPC による検討はすべて酸性側における着色に限定した。結果は第 3 表に示す如く SM にもとづく着色色素も SBA にもとづく着色色素もともに 4 種の色素の混合系であり、全く同じものであることを認めた。これら 4 種の色素を濾紙より水で溶出し可視部吸収を測定した結果を第 6 図に示す。

着色物質形成において 305~310 mμ に吸収を示す物質を通して着色反応の進行することがうかがえる。

(4) 着色におよぼす各種ガスの影響： SM および SBA の塩酸加熱処理液の着色におよぼす各種ガスの影響を検討した。実験の結果を第 1 表に示す。空気、酸素、炭酸ガスの bubbling により着色は抑制される。酸素が SM の着色に抑制的に作用することはその着色が酸化⁽⁷⁾により容易に脱色されることからもうなずかれるところである。窒素ガスの bubbling により着色の濃厚化が認められた。少なくとも SM および SBA の塩酸加熱処理液にもとづく着色は非酸化的着色反応に属するものと考えられる。

(5) カラメル臭の発生： アミノ酸・糖系の褐変あるいは糖質自体の高温処理に伴う褐変の際、pH の低下に併行して発現する特異的現象にカラメル臭の発生が挙げられる⁽⁸⁾が SM 及び SBA 塩酸加熱処理液の着色時にもこれが明瞭に認められ、かつカラメル臭の強度はその着色度とほぼ併行するものであった。また酸性側における着色よりアルカリ側における着色時により強いカラメル臭が感じられた。カラメル臭の本体については今後の検討に待たねばならない。

(6) マルトール、STD および STD 塩酸加熱処理液の影響： SBA 塩酸加熱処理液の着色におよぼすマルトール、STD、STD 塩酸加熱処理液の影響を検討した。結果は第 2 表の如くである。マルトール、STD、STD 塩酸加熱処理液ともに着色を促進せず着色反応に関与しないものと考えられる。なお SM の他方の分解

第 3 表 4 種の色素 (P_1 , P_2 , P_3 , P_4) の color と各種呈色反応およびペーパークロマトグラムにおける R_F 値

	R_F	Color	呈 色 反 応					
			アルカリ性 硝酸銀	Elson- Morgan	Ninhy- drin	Pauly	坂口	マルト ール
P_1	0.38~0.39	Pinkish-Orange	白くぬける	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
P_2	0.45~0.47	Orange	(+) 褐色	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
P_3	0.55~0.59	Pink	(+) 淡褐色	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
P_4	0.70~0.72	Yellow	(±) "	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

〔註〕 (1) 塩酸加熱処理時の SM, SBA および HCl 濃度

(i) SM 83 mg 力価/ml (0.67 N HCl 溶液)

(ii) SBA 33 mg/ml (0.33 N HCl 溶液)

(2) 呈色時の pH 4.0

第 6 図 4 種の色素 (P_1 , P_2 , P_3 , P_4) の可視部吸収曲線

なおこれら 4 種の色素はいずれも酸化により完全に脱色された。

考 察

SM 分子中 STD と streptose の間の glycosidic 結合は streptose と N-methyl-L-glucosamine の間のそれより遙かに弱く⁽⁹⁾, 酸処理により容易に加水分解して STD と SB を生成する^(10,11)が, 純 SB の単離が困難なため著者らはまず純 SBA を単離しその塩酸加熱処理を行い着色の検討を行った。塩酸加熱処理により SBA から, SB と同様活性カルボニル基を有するところの methyl streptobiosaminide が生成する⁽¹²⁾が, さらに streptose および N-methyl-L-glucosamine あるいはそれらの分解物までの反応の進行の可能性も考えられる。しかしいずれにしても SM の酸加水分解物の他の一つである STD が着色に関与せず, かつ SM にもとづく着色色素と SBA にもとづく着色色素と全く同じであるところから, SM 分子中の SB 部分が SM 着色の前駆物質であることは明らかである。また着色反応機構に関しては中間生成物の分離・同定により明らかにされ得るものであるが, この点, 着色反応過程における紫外吸収の発現は着色物質生成の先行反応としての意義を持つものと推定され, 今後究明すべき余地を残すものと考えられる。

なお, さきに第 1 報⁽¹⁾において SM の着色がカルボニル試薬の添加によるカルボニル基の block によりほとんど阻止されるところから反応機構にアミノ・カルボニル反応の介在を予想したが, 前記諸現象もまた本反応の特徵的現象に一致するものであり, SM の着色も一種のアミノ・カルボニル反応であると考えられる。

要 約

SM あるいは SBA の塩酸加熱処理液の着色において, 窒素化合物による促進現象および着色反応の進行に伴う反応液の pH の低下, 紫外吸収の発現, カラメル臭の発生等が認められた。また着色時におけるガスの影響として窒素ガスが着色を濃厚化せしめたのに対して酸素は抑制的に作用した。SM の分解物であるマルトール,

STD は着色を促進せしめなかった。なお SM および SBA の塩酸加熱処理液にもとづく着色色素はともに 4 種の色素の混合系であり、全く同じものであることを認めた。かつ塩酸加熱処理時の条件の相違により構成色素の成分数が異なるものであった。

上記結果より SM 分子中の SB 部分が SM 着色の前駆物質であり、かつその着色反応が一種のアミノ・カルボニル反応であろうと考えた。

終りに本研究の発表を御許可くださった明治製菓株式会社中川 昶取締役、片山正夫工場長に厚く感謝の意を表するとともに、本研究を行うにあたり終始御便宜をいただいた製菓課長安田春太郎博士に深謝いたします。

-
(1) 菅野能範, 若沢 正ら : 明治製菓研究年報, 第 3 号, 7 (1960).	(7) Merck & Co. Inc. : B. P. 696, 886, Sept. 9 (1953).
(2) J. E. Hodge : <i>J. Agr. Food. Chem.</i> , 1 , 928 (1953).	(8) 足立 達 : 化学の領域, 9 , 363 (1955).
(3) N. G. Brink : <i>J. Am. Chem. Soc.</i> , 68 , 2557 (1946).	(9) S. A. Waksman : "Streptomycin", Williams & Wilkins Co., p. 58, (1949).
(4) 菅野能範, 若沢 正 : 本誌, 37 , 743 (1963).	(10) N. G. Brink et al. : <i>Science</i> , 102 , 506 (1945).
(5) J. Fried : <i>J. Am. Chem. Soc.</i> , 70 , 3615 (1948).	(11) R. L. Peck et al. : <i>J. Am. Chem. Soc.</i> , 68 , 29 (1946).
(6) R. L. Peck : <i>ibid.</i> , 68 , 29 (1946).	(12) J. Fried et al. : <i>ibid.</i> , 69 , 79 (1947).
-