8. 山岸正治：Ninhydrin 反応の研究 (第2報) Ninhydrin 反応の中間成績体

Masaharu Yamagishi: Studies on Ninhydrin Reaction. II.

The Intermediates in Ninhydrin Reaction.

(Research Laboratory, Takeda Pharmaceutical Industries, Ltd.*)

α -アミノ酸の呈色反応として Ruhemann¹⁾ によつて発見された ninhydrin 反応はその後或る種の脂肪族第1級アミン, NH_3 , NH_4 塩等に対しても陽性であることが知られ, 結局本反応はこれ等化合物に triketohydrindene hydrate (ninhydrin) が反応して, 色素 diketohydrindylidenediketohydrindamine (I) (Ruhemann purple) を生成する反応であることが判かっている。

しかしながら本反応の機構, 特に α -アミノ酸, アミン類に対する機構に関しては, 発見者 Ruhemann 及び Harding²⁾ 或いは最近に於ける Fadyen³⁾ 等の研究にも拘わらず, 未だ充分な解決は与えられていない。本研究は本反応機構考察の一手段として行われたものである。

1948 年 Schönberg⁴⁾ は α -アミノ酸の ninhydrin による分解反応の機構として次のような反応式を推定した。

本反応式は ninhydrin 反応の機構に関連して極めて興味あるもののように思われる。何となれば本反応式はアミン類の反応に対しても推定でき, しかも中間物質 (II) に対して次の反応式 (A) を考えることによつて Ruhemann purple の生成が可能となり, これ等一連の反応式によつて ninhydrin 反応に於ける種々の現象 (例えばアミン類の化学構造と ninhydrin 反応との関係) が極めて合理的に説明できるからである。

Schönberg 等は前記反応式の実験的証明法として, アルデヒドの生成を報じているのみなので, 著者は中間物質 (II) を単離すべく種々努力し, 遂に 2-methyl-4-amino-5-aminomethylpyrimidine, 2-methyl-4-hydroxy-5-aminomethylpyrimidine の2アミン体から夫々 ninhydrin 反応の中間成績体を単離することに成功した。これ等の物質の分析値は夫々次の構造式 (III), (IV) 即ち 2-methyl-4-aminopyrimidyl-(5)-methylidenediketohydrindamine, 2-methyl-4-hydroxypyrimidyl-(5)-methylidenediketohydrindamine から計算した値と極めてよく一致した。

* Juso-nishino-cho, Higashiyodogawa-ku, Osaka. 1) S. Ruhemann: J. Chem. Soc. **1911**, 1491.

2) V. J. Harding, R. M. MacLean: J. Biol. Chem. **25**, 337 (1916).

3) D. A. MacFadyen: Ibid. **186**, 1 (1950).

4) A. Schönberg, R. Moubasher, A. Mostafa: J. Chem. Soc. **1948**, 176.

前者の諸性質（後述）からもこれ等の構造式は妥当であると思われるが、尙お詳細な検討を続行中である。

alloxan がアミン類と反応して purpuric acid を生成する反応も ninhydrin 反応と同様の反応機構によつて進行するものと思われるので、当然前記同様の中間成績体が期待される。そこで前記 2 つのアミン体に対して alloxan を反応させてみた所、中間成績体として夫々次の構造式 (V), (VI) を有すると思われる結晶を単離することができた。しかしこれ等の物質は ninhydrin との反応の場合にくらべて更に生成条件が難しく、且つ再結晶等の精製手段がないため、その分析値は理論値と一致するに至らなかった。

著者の得た構造式 (III) に該当すると思われる物質は、外観褐色の粉末で顕微鏡下にこれを検すると黄色の微細な針状結晶である。

本品は水に不溶、アルコール、ベンゼン等の有機溶媒に難溶で加熱すれば部分分解する。水酸化ナトリウム等のアルカリ水溶液に橙赤色にとけるが、長時間放置すれば分解する。ビリジンは比較的安定にとけて橙黄色となる。

ビリジン溶液はそのまま沸騰水浴中で加熱しても格別の変化は見られないが、これに ninhydrin を添加して加熱すると、短時間に Ruhemann purple を生成する。Fig. 1 は実験の部に述べるように操作して得た呈色液の吸収スペクトルで、曲線 I は明らかに Ruhemann purple の吸収スペクトルであり、著者の得た中間成績体が更に ninhydrin と反応して Ruhemann purple を生成することを示している。曲線 II は本品の吸収スペクトルを表わす。

Fig. 1.

以上の事実から著者の得た 2 つの ninhydrin 反応中間成績体は前記 Schönberg の反応式中の中間物質 (II) に該当すると思われ、ninhydrin 反応の機構として反応式 A が推定される。

終りに臨み本研究の機会を与えられた研究所長桑田 智博士に謹謝し、元素分析の労をとられた当所元素分析室の諸氏に感謝する。

実 験 の 部

2-Methyl-4-amino-5-aminomethylpyrimidine の Ninhydrin 反応中間成績体 ninhydrin 0.5 g を溶かした pH 7 の Theorell 緩衝液 20 cc に 2-methyl-4-amino-5-aminomethylpyrimidine の塩酸塩 0.6 g を加えて溶かし、尙少量のビリジンを添加して濾過、放置する。液は一旦橙色となり暫くして橙赤色の沈澱が生成し始める。1 夜放置後これを濾取し、水、アルコールで充分洗滌して P_2O_5 のデシケーター中に乾燥。収量 0.4 g。

黄色微細な針状品。分解点 250° 附近 (不明瞭)。再結晶困難でそのまま元素分析を行う。C₁₅H₁₃O₂N₄·2 H₂O 計算値 C 56.96, H 5.10, N 17.71, H₂O 11.39, 実験値 C 56.69, H 5.46, N 17.39, H₂O 11.11.

2-Methyl-4-hydroxy-5-aminomethylpyrimidine の Ninhydrin 反応中間成績体 2-methyl-4-hydroxy-5-aminomethylpyrimidine の塩酸塩 0.2 g をメタノールに溶かし、これに ninhydrin 0.1 g を加え、 H_2O を加えて常温に放置。黄色沈澱が徐々に析出し、同時に液は赤黒色となる。冷却して反応を止め、 H_2O を加えて充分洗滌。収量 0.05 g。黄色の微細柱状品、分解点 250° 附近 (不明瞭)。水、アルコールその他の溶媒に不溶、水酸化ナトリウム水溶液、ピリジンに橙赤色に溶ける。本品を再結晶困難でそのまま元素分析を行う。C₁₅H₁₃O₃N₃ 計算値 C 64.05, H 3.94, N 14.94, 実験値 C 64.09, H 3.93, N 14.77.

2-Methyl-4-amino-5-aminomethylpyrimidine と Alloxan との反応 2-methyl-4-amino-5-aminomethylpyrimidine 1 g, alloxan 0.5 g を各々メタノールに溶かし、 H_2O を加えて混合する。沸騰水中に 2~3 分浸した後放置すると内容は橙色になり赤紅色の沈澱が析出。これを H_2O で洗滌した後 P₂O₅ デシケーター中で乾燥。収量 0.25 g。顕微鏡下黄色粒状の結晶、分解点 190° 附近 (不明瞭)。水及びアルコールその他の有機溶媒に不溶で水酸化ナトリウム水溶液に溶けて紫色を呈する。

2-Methyl-4-hydroxy-5-aminomethylpyrimidine と Alloxan との反応 2-methyl-4-hydroxy-5-aminomethylpyrimidine の塩酸塩 0.25 g, alloxan 0.1 g を各々メタノールに溶かし H_2O を加えて混合した後 70° に加温すると鮮黄色の沈澱が析出。収量 0.03 g。顕微鏡下黄色粒状の結晶、分解点 190° 附近 (不明瞭)。水に不溶、アルコールその他の有機溶媒に不溶で水酸化ナトリウム水溶液に溶けて黄色を呈する。

Ninhydrin 反応中間成績体と Ninhydrin との反応 2-methyl-4-amino-5-aminomethylpyrimidine の ninhydrin 反応中間成績体を構造 (III) (+2 H₂O) として 0.5 mol 濃度になるようにピリジン水溶液 (1:1) に溶かし、その 2 cc (本品 10^{-6} mol に相当) に著者の α -アミノ酸比色定量法の発色操作を施し、盲検液を対照として吸収スペクトルを観測した (Fig. 1)。Ruhemann purple の生成量は α -アミノ酸 10^{-6} mol について行つた時と略々同程度であつた。別に上記ピリジン溶液 2 cc を発色操作を行わず水でうすめて 20 cc としその吸収スペクトルを観測した。

武田薬品工業株式会社研究所

Summary

Intermediate products of ninhydrin reaction were obtained from 2-methyl-4-amino- and 2-methyl-4-hydroxy-5-aminomethylpyrimidine. The analytical values of these substances agreed extremely well with the values calculated for 2-methyl-4-aminopyrimidyl(5)- and 2-methyl-4-hydroxypyrimidyl(5)-methylidenediketohydrindamine, and they give Ruhemann purple by reacting further with ninhydrin.

(Received October 15, 1953)