の水に溶解せる溶液を加え、暫時攪拌後 ethyl *p*-toluenesulfonate 3.2 g の 30 cc エタノール溶液を加え、40～50° に 1 時間加温反応せしめる。S-methyl B₁ の場合と同様処理し、粗結晶 2.7 g を得。熱湯より再結晶し無色微細針状晶、mp 194～195°。C₁₄H₂₂O₂N₄S 計算値 C 54.18, H 7.15, N 18.05, 実験値 C 54.40, H 7.02, N 18.06, 塩酸塩：無色稜柱状晶、mp 122～123° (decomp)。C₁₄H₃₃O₂N₄ClS 計算値 C 48.48, H 6.68, N 16.16, 実験値 C 47.99, H 7.09, N 15.82。

S-Propylthiamine (XII) B₁ 塩酸塩 3.4 g を 30 cc の水に溶解し、2 N NaOH 水溶液 17 cc を氷冷攪拌下滴下、暫時後 propyl *p*-toluenesulfonate 3.2 g の 50 cc エタノール溶液を加え、40～45° に 10 分間加温反応せしめる。常法通り処理し酢酸エチル抽出液を濃縮し、無水ベンゼンを加えて放置すると無色柱状晶が析出。2.4 g。mp 120～127°。直ちに固化し 169～172° で再び熔融。熱湯、ベンゼン、またはエタノール・エーテルからくり返し再結晶すると無色微針状晶、mp 172～174°。C₁₅H₂₄O₂N₄S 計算値 C 55.54, H 7.46, N 17.27, 実験値 C 55.48, H 7.24, N 17.02。

S-Butylthiamine (XIII) B₁ 塩酸塩 5.0 g を 30 cc の水に溶解し、氷水冷却下 2 N NaOH 水溶液 22.5 cc を滴下し暫時攪拌後、butyl *p*-toluenesulfonate 3.4 g を 40 cc のエタノールに溶解せる溶液を加え、50～53° に 1 時間 50 分加温反応せしめる。途中 2 N NaOH 水溶液 7.5 cc を追加。前記同様処理して 3.5 g の粗結晶を得。熱湯から再結晶し無色針状晶。mp 151～153°。C₁₆H₂₆O₂N₄S 計算値 C 56.78, H 7.74, N 16.56, 実験値 C 57.35, H 8.09, N 16.82。また無水ベンゼンより再結晶する時は無色稜柱状晶、mp 124～125.5°。実験値 C 57.28, H 7.84, N 16.22。両者は再結晶の溶媒を交換することにより互いに転換し得。またアセトンを含む水から再結晶する時は無色針状晶。mp 123～127° (半熔融)。後固化し 152～153° で再び熔融。塩酸塩：無色稜柱状結晶。mp 95～99°。C₁₆H₂₈O₂N₄ClS · 1/2 C₂H₅OH 計算値 C 51.28, H 7.60, N 14.08, 実験値 C 51.25, H 7.61, N 14.01。

田辺製薬株式会社大阪研究所

U.D.C. 544.81 : 547.757 : 547.466

149. 中島正太郎, 奥山源一：トリプトファンとパラジメチルアミノペンツアルデヒ

Fの呈色の安定性に及ぼすアミノ酸その他化合物の影響

Shotaro Nakajima and Gen-ichi Okuyama : Effect of Amino Acids and Other Compounds on the Color Reaction of Tryptophan and *p*-Dimethylaminobenzaldehyde.

(Taisho Pharmaceutical Co. Ltd.*)

The Ehrlich reaction, the blue coloration formed by the reaction of tryptophan and *p*-dimethylaminobenzaldehyde in strong acid solution, is accelerated by heating the solution or by the addition of an oxidation agent but at the same time, the color becomes unstable and liable to be discolored. In this case, the addition of acid hydrolyzate of proteins effects stabilization of coloration and prolongation of the maintenance period of maximum coloration. In order to find substances which can stabilize this coloration, various amino acids were submitted to the test. It was found that methionine effected the greatest stabilization of the color, the color formed having been maintained over three months. This was followed by cystine, tyrosine, histidine, aspartic acid, and glutamic acid, which possessed a certain amount of stabilization effect, while the action of other amino acids was weaker. As for compounds other than amino acid, levulic acid possessed a strong action similar to that of methionine, while pyruvic acid and fructose also possessed a fairly strong action. These results indicated that compounds possessing a sulfur atom or a carbonyl group possessed strong action. Based on these results, 0.1～1.0% solution of methionine was adopted as the solvent for the coloration solution of tryptophan, in place of acid hydrolyzate of proteins.

(Received March 2, 1956)

トリプトファンは *p*-dimethylaminobenzaldehyde の硫酸溶液即ち Ehrlich 試薬と反応すると青色を呈する。この呈色は Salkowski¹⁾ によつて蛋白の検知反応として知られていたが、トリプトファンの反応としては

* Toshima-ku, Tokyo.

1) E. Salkowski : Z. physiol. Chem. (Hoppe-Seyler's) **12**, 220(1888).

Rohde²⁾ によつて初めて認められ更に Herzfeld³⁾ が定量に用いた. その後定量法としては幾多の改善が加えられた. 本呈色はその発現が緩慢であるため呈色を促進する目的で過酸化水素, 硝酸ソーダの如き酸化剤を用い且つ僅かに加温を行う. また日光, 紫外線にも呈色促進作用があり鉄, 硫化水素の如き還元剤は呈色を阻害する. また呈色促進剤は Komm⁴⁾ が認めている通り呈色の促進と同時に褪色も促進しその量が過剰なれば最大呈色の発現を阻害する. 検体中に還元性物質が存在すると呈色促進剤の所要量も増大する. 呈色促進の条件に就いては多数の報告がある. 定量の場合は検液の呈色を標準液の呈色と比較し含量を定めるが標準液の溶媒には水以外に蛋白酸分解物の希薄液を用いることが多い. 蛋白質の検体は普通 $N \sim 5 N$ 苛性ソーダで分解し検液とし, 標準液も同濃度の苛性ソーダ液とする. トリプトファン水溶液は加温及び酸化剤添加で呈色は不安定でかなり速かに褪色する. カゼインの酸分解物を溶媒に用いると呈色が安定で褪色が遅く比色が正確に出来る. 但しこの呈色安定の効果に就いては従来充分な検討を行つたものを求めることが出来なかつた. Komm⁴⁾ はゼラチンの如くトリプトファンを含め蛋白を添加すると呈色を促進すること及びアミノ酸中プロリンのみがこの作用があることを認めた. Boyd⁵⁾ は純トリプトファンの水溶液は褪色し易いことを認めた. Sullivan 等⁶⁾ はトリプトファンの水溶液中で正確な呈色が得られないのはトリプトファンが熱強酸液中で不安定なためであるとし, カゼインの酸分解物の如きアミノ酸混合物をトリプトファン液に加えると安定な標準液の得られることを認めた. Steers 等⁷⁾ はトリプトファンのアルカリ液に加熱時の分解を防止する目的でカゼインの酸分解物を添加した. 著者等はカゼイン分解物を溶媒とした場合に呈色が安定するのはその中のどの成分に基づくものかを明らかにするため本実験を行つた. 本報告で呈色安定化作用なる語を用いたが, これは呈色条件の多少の変動で呈色に差異を生ぜず且つ最大呈色の持続時間を延長させる作用であり, 呈色促進剤の如く最大呈色に達する時間を短縮するが同時に褪色も早める作用のあるものとは区別して考えている.

アミノ酸混合液の呈色安定化作用 カゼインの酸分解液と組成の似たアミノ酸混液として 17 種のアミノ酸をカゼインの組成に近似の比に混合した液を製し, これを溶媒としトリプトファンの呈色の強さと持続状態をカゼイン分解液と比較した (Table I) とところ, トリプトファンの呈色の強さ及び持続は両者ほぼ同一であつた. 即ちこのアミノ酸混液中にはカゼインの酸分解液と同程度の強さの呈色安定化作用が存在することが明らかである.

各アミノ酸の呈色安定化作用 上の混合アミノ酸液中で呈色安定化作用を達成したのは何れのアミノ酸であるかを明らかにするため, 個々のアミノ酸に就いて同様の実験を行つた (Table II). アミノ酸は何れも呈色を安定化する作用があるが, その程度には差異がありメチオニンが最も強く, 呈色は 3 ヶ月以上持続し, シスチンこれに次ぐ. 即ち含硫アミノ酸が最も安定化作用が強い. チロジン, ヒスチジン, アスパラギン酸, グルタミン酸も中等度の作用がある. グリシン, アラニン, バリン, ロイシン等特殊の基を有しないモノアミノモノカルボン酸及びアルギニン, リジンは安定化作用が最も劣る.

各種有機化合物の呈色安定化作用 アミノ酸以外の有機酸, 糖類等数種の有機物に就いても同様の実験を行つた (Table III) とところ, レブリン酸がメチオニンに近い作用のあることを認め, またピルビン酸, 果糖も有効である. 即ちケトン基を有する化合物が安定化作用が強くブドウ糖等には安定化作用を全く認めない.

メチオニン液の呈色安定化作用 a. **メチオニン液の濃度と呈色安定化作用** メチオニン液は強い呈色安定化作用があるが更にメチオニン液の濃度を 0~2%迄変えその影響を検した (Table IV). メチオニン液は 1.5% 以上では幾分呈色を阻害するが 0.02~1.0%では呈色に全く差がない. 即ちこの範囲内ではメチオニンの含量によつて呈色値に誤差を生ずることはない. この呈色を 24 時間後に比色しても 0.5~1.0%では全く同一であり, また希薄な液では幾分褪色を認めた.

b. **加温条件の差異の呈色変化に対する効果** 呈色操作中の加温条件即ち温度, 時間を変えてその時の呈色の変化を水溶液及びカゼイン酸分解液の場合と比較した (Table V). 水溶液は温度, 時間及び酸化剤等の条件と呈

2) E. Rohde: Z. physiol. Chem. (Hoppe-Seyler's) **44**, 161(1905).

3) E. Herzfeld: Biochem. Z. **56**, 258(1913).

4) E. Komm: Z. physiol. Chem. (Hoppe-Seyler's) **156**, 35(1926).

5) W. Boyd: Biochem. J. (London) **23**, 78(1929).

6) M. X. Sullivan, H. S. Milone, E. L. Everitt: J. Biol. Chem. **125**, 471(1938).

7) E. Steers, M. G. Sevag: Anal. Chem. **21**, 641(1949).

色に関し Spies 等⁸⁾の報告がある。定量には呈色促進のため一定条件例えば 56°, 1 分間の加温を行うが温度が低いと時間が短かれば呈色が不完全となり温度が高過ぎるか時間が長過ぎれば褪色が起り呈色が低くなる。故に呈色の変動を防止するには加温条件を厳密に一定にする必要があるが、実際には試験管の肉厚或いは室温の差異による冷却度の相異等のため反応液が受ける加温条件の幾分の差異は免れない。故に溶媒としては多少の加温条件の差異によつても呈色に変化を起さない安定化作用の強いものが好適である。水溶液は加温が過ぎれば呈色が著しく減少し、呈色は不安定である。カゼイン分解液中では呈色は安定であるが加温時間が長くなればやはり幾分呈色が減少したが、メチオニン液では呈色は著しく安定で加温条件のかかなりの差異即ち温度 50~56°, 時間 30~120 秒の程度の差異では呈色は全く影響を受けない。故に加温条件の実験誤差程度の差異では勿論呈色に差異を生じることなく正確な比色が可能である。

c. 呈色促進剤の添加量の差異の呈色変化に対する効果 呈色促進に加える硝酸ソーダ液量を変化した場合の呈色に及ぼす影響を水溶液及びカゼイン酸分解物溶液と比較した (Table VI). 水溶液は硝酸ソーダ液量の多少は直ちに呈色の発現及び褪色に鋭敏に影響するがメチオニン液及びカゼイン分解液では 0.8%硝酸ソーダ液 0.05~0.15 cc の範囲では殆んど差異を生じない。故に操作中の実験誤差程度の添加量の差では全く影響を受けない。

d. 苛性ソーダ液中での呈色安定化作用 トリプトファンの苛性ソーダ液とこれにカゼイン酸分解物或いはメチオニンをそれぞれ 1%に添加した液の呈色の安定度を検討した (Table VII). 一般に呈色は幾分低いがトリプトファンの苛性ソーダ液ははなはだ褪色し易いのに対しカゼイン酸分解液及びメチオニン液の呈色は安定である。

結 論 トリプトファンと *p*-dimethylaminobenzaldehyde の反応にカゼイン酸分解物を添加すると呈色が安定化されるのはその中のアミノ酸類の作用であり、メチオニンはこの作用が最も強い。この成績を利用してメチオニン 0.1~1.0%液はトリプトファン呈色液の溶媒としてカゼイン酸分解物と同様に用いることが出来る。

Table I. Color Stabilizing Effect of Amino Acid Mixtures

Composition of medium (%)	Tryptophan content (γ/cc.)	Absorbance		
		15 mins.	24 hrs.	48 hrs.
Water	100	0.305	0.10	—
Casein acid-hydrolysate 1	"	0.345	0.33	0.32
Amino acid mixtures* 1	"	0.345	0.34	0.34

* L-Arginine HCl, L-Alanine, L-Aspartic acid, L-Cystine, Glycine, L-Histidine HCl, DL-Methionine, DL-Phenylalanine, DL-Serine, DL-Threonine, L-Tyrosine, DL-Valine

DL-Isoleucine, DL-Leucine, DL-Lysine HCl, L-Proline
L-Glutamic acid

1 part
2 parts
5 parts

Table II. Color Stabilizing Effect of Individual Amino Acid

Composition of medium (%)	Tryptophan content (γ/cc.)	Absorbance				
		15 mins.	24 hrs.	48 hrs.	120 hrs.	100 days
DL-Methionine 1	100	0.345	0.345	0.345	0.32	0.17
L-Cystine "	"	0.305	0.275	0.26	0.22	—
L-Tyrosine "	"	0.32	0.22	0.185	0.135	—
L-Histidine HCl "	"	"	0.235	0.145	+	—
L-Glutamic acid "	"	0.335	0.255	0.19	+	—
L-Aspartic acid "	"	0.28	0.275	0.175	+	—
DL-Threonine "	"	0.275	0.20	0.115	+	—
DL-Serine "	"	0.29	0.16	0.075	+	—
Glycine "	"	0.285	0.14	0.07	—	—
DL-Phenylalanine "	"	0.255	0.135	0.06	—	—
L-Proline "	"	0.325	0.09	+	—	—
DL-Valine "	"	0.30	0.06	—	—	—
L-Arginine HCl "	"	"	"	—	—	—
DL-Lysine HCl "	"	0.27	0.05	—	—	—

8) J. R. Spies, D. C. Chamber: Anal. Chem. 20, 30(1948).

DL-Leucine	//	//	0.32	—
DL-Isoleucine	//	//	0.29	—
L-Alanine	//	//	//	—
Water	//	//	//	—

+ : Slightly colored (0.05 or less) — : Completely faded

Table III. Color Stabilizing Effect of Several Organic Compounds

Composition of medium (%)		Tryptophan content (γ/cc.)	Absorbance				
			15 mins.	24 hrs.	48 hrs.	120 hrs.	100 days
Levulinic acid	1	100	0.335	0.33	0.31	0.27	0.11
Levulose	//	//	//	//	0.30	0.23	0.085
Pyruvic acid	//	//	0.32	0.32	//	0.21	0.07
Alliine	//	//	0.23	0.20	0.20	0.18	—
Diacetyl	//	//	0.24	0.215	0.21	//	—
Sulfanilamide	//	//	0.30	0.27	0.25	//	—
Urea	//	//	//	0.215	0.20	0.15	—
Acetone	//	//	0.32	0.26		+	—
Methanol	//	//	0.315	0.125	—		
Dextrose	//	//	0.25	—			
Propylene glycol	//	//	0.24	—			
Acetic acid, glacial	//	//	//	—			
Citric acid	//	//	0.22	—			
Thioglycollic acid	//	//	—	+	+	—	
Phenol	//	//	red				red
//	0.01	//	0.32	—			

Table IV. Color Stabilizing Effect of Methionine

Composition of medium (%)	Tryptophan content (γ/cc.)	Absorbance			
		15 mins.	24 hrs.	48 hrs.	120 hrs.
Water	100	0.29	—		
DL-Methionine	0.01	0.345	—		
//	0.02	//	—		
//	0.05	//	0.25	+	—
//	0.1	//	0.345		0.28
//	0.2	//	//		0.30
//	0.5	//	//	0.345	0.32
//	1.0	//	//	//	//
//	1.5	0.335			0.33
//	2.0	0.325			//

Table V. Color Stabilizing Effect of Methionine to Heat Condition

Composition of medium (%)	Tryptophan content (γ/cc.)	Heat Condition		Absorbance	
		Temperature (°C)	Time (mins.)	15 mins.	24 hrs.
Water	100	56	0.5	0.32	—
//	//	//	1	0.29	—
//	//	//	1.5	0.285	—
//	//	//	2	0.22	—
//	//	50	1	0.24	—
Casein acid-hydrolysate 1	//	56	0.5	0.345	0.34
//	//	//	1	0.34	0.33
//	//	//	1.5	0.32	0.30
//	//	//	2	0.30	0.28
//	//	50	1	0.345	0.34
//	//	//	2	//	//

DL-Methionine	1	"	56	0.5	"	0.345
"	"	"	"	1	"	"
"	"	"	"	1.5	"	0.34
"	"	"	"	2	0.34	0.32
"	"	"	50	1	0.345	0.345
"	"	"	"	2	"	"

Table VI. Color Stabilizing Effect of Methionine to Content of Oxidizing Agent

Composition of medium (%)	Tryptophan content (γ /cc.)	Oxidizing agent 0.8% NaNO ₃ soln.(cc.)	Absorbance	
			15 mins.	24 hrs.
Water	100	0.05	0.33	0.18
"	"	0.1	0.29	—
"	"	0.15	0.20	—
Casein acid-hydrolysate 1	"	0.05	0.34	0.34
"	"	0.1	0.345	"
"	"	0.15	"	"
DL-Methionine 1	"	0.05	"	0.345
"	"	0.1	"	"
"	"	0.15	"	"

Table VII. Color Stabilizing Effect of Methionine in *N* NaOH

Composition of medium	Tryptophan content (γ /cc.)	Absorbance	
		15 mins.	24 hrs.
<i>N</i> NaOH	100	0.25	—
1% Casein acid-hydrolysate, <i>N</i> NaOH	"	0.29	0.29
1% DL-Methionine, <i>N</i> NaOH	"	"	"

実 験 の 部

供試薬品の調製法 DL-トリプトファン (The British Drug Houses LTD 製), DL-メチオニン (関東化学特級), その他のアミノ酸類 (和光純薬或いは関東化学特級), スルファミン (局方), アリイン (Stoll 等⁹⁾ の方法で自製), カゼイン酸分解液 (Caseinum nach Hammarsten, E. Merck を原料として福田¹⁰⁾ の条件で塩酸で加水分解), その他の薬品 (関東化学特級)。

トリプトファン含有溶液の調製 DL-トリプトファン 0.02%液と DL-メチオニン 2%液の等量を混和して DL-トリプトファン 100 γ /cc 含有のメチオニン 1%液とする。同様に他のアミノ酸或いはカゼイン分解物含有のトリプトファン水溶液或いは *N* 苛性ソーダ液も調製。

トリプトファンの比色定量法^{7,10)} 長さ 16 cm, 内径 1.5 cm の共栓試験管に検液 1 cc, 5% *p*-dimethylaminobenzaldehyde の 10%硫酸溶液 0.1 cc, 0.8%硝酸ソーダ 0.1 cc, 濃塩酸 5 cc を加え 56° の温浴中に 1 分間浸漬した後取出して室温に 15 分間放置し, 次に 17.5%塩酸 4 cc を加え内容を混和し, 15 分間放置後, 光電比色計 (東京光電研究所製) で橙色フィルター (570 m μ) を用い液層の厚さ 0.5 cm で比色。数値はすべて吸光度で表わした。

呈色の安定度の比較 上の条件で比色後暗所に室温で一定時間放置し, 再び同様に比色しその呈色度の変化を比較する。

大正製薬株式会社研究部

9) A. Stoll, E. Seebeck: Helv. Chim. Acta **31**, 189(1948).10) 福田: 本誌 **73**, 329(1953).