れた京大元素分析センターの諸氏，IR スペクトルを測定された京大薬学部 町田，浜中両氏および Sadtler Research Laboratories ならびに実験に協力頂いた明治薬科大学の森氏および分析学研究室の方々に感謝致します。

明治薬科大学

UDC 547.478.6.07 : 542.943

85. 敵本 力：クロラミン T・過ヨード酸混合酸化剤による セリン，スレオニンの分解

Tsutomu Unemoto : A New Decomposition of Serine and Threonine
by Chloramine-T and Periodate Mixture.

(Institute of Food Microbiology, Chiba University*1)

Recently, it was found that cyanogen chloride is formed by the oxidation of β -hydroxyamino acid with a mixture of Chloramine-T and periodate. Therefore serine and threonine were decomposed by the mixed oxidizer and oxidation products were identified by preparing derivatives and quantitative analysis. From the data obtained, it was concluded that serine and threonine are decomposed by the mixed oxidizer according to the following equation :

(Received April 21, 1961)

β -hydroxyamino acid は過ヨード酸 (IO_4^- と略記) により (1) 式のように分解されるので，この反応はセリン，スレオニンの定量手段として広く用いられている。¹⁻³⁾

一方 Dakin^{4,5)} の報告によると，アミノ酸はクロラミン T (Ch-T と略記) の等 mol と反応してアルデヒドとアンモニアに ((2) 式)，Ch-T の 2 倍 mol 使用によりニトリルに分解される ((3) 式) といわれている。

著者は Ch-T と IO_4^- とを混合して β -hydroxyamino acid を分解したところ，酸化剤の量および反応の pH を適切に選ぶと，冷時においても cyanogen chloride (CICN) が生成されることを見出したので，セリン，スレオニンについてその分解産物を定量的に検討し，分解の様式を明らかにした。

まずセリンを混合酸化剤で分解して生成する物質をガスクロマトグラフィーで分析した結果は Fig. 1 に示す如くであった。これは反応液にヘリウムガスを通気してガスサンプル計量管に導き，Diocetyl Phthalate-A を充填剤として定性的分析を行なった結果で，二酸化炭素，CICN の生成が明らかに認められた。スレオニンについても同様の結果を得た。

つぎに CICN の生成を化学的に証明するために反応液に窒素ガスを通気し，2-aminothiophenol のブタノー

*1 Okubo, Narashino, Chiba-ken.

1) J. C. Dittmer, J. L. Feminella, D. J. Hanahan : J. Biol. Chem. 233, 862(1958).

2) B. A. Neiding, W. C. Hess : Anal. Chem. 24, 1627(1952).

3) M. Hayashi, K. Miyaki, T. Unemoto : Chem. Pharm. Bull. (Tokyo) 8, 904(1960).

4) H. D. Dakin : Biochem. J. 10, 319(1916).

5) H. D. Dakin : Ibid. 11 79(1917).

Fig. 1.
Gas-chromatogram of Products obtained by
Oxidation of DL-Serine with Chloramine-T
and Periodate Mixture.

ル溶液中⁶⁾に導くと結晶が得られた。この結晶を水に溶解し微アルカリ性とし、析出する沈殿を水から再結晶し、別に Skraup の方法⁷⁾で合成した 2-aminobenzothiazole (mp 132°) と混融して融点降下なく元素分析の値も一致した。したがってここに得られた結晶は 2-aminobenzothiazole であり、セリンが混合酸化剤により分解されて生じる物質は CICN であることが確認された。

さきに著者はこの反応で生成される CICN を特異的呈色試薬である pyridine-pyrazolone 試薬⁸⁾を用いて定量することにより、セリン、スレオニンを比色定量する方法を報告した。⁹⁾ Table I はこの方法にしたがいシアニ化カリウムを用いて検量線を作成し、セリン、スレオニンから生じる CICN の量をシアニ化カリウムの量として計算したものである。シアニ化カリウムからの CICN の生成は混合酸化剤による場合でも、Ch-T 単独による場合でも全く同じ結果を得たので、セリンおよびスレオニンから生成される CICN の量はシアニ化カリウムから Ch-T により生成される CICN の量とほぼ一致することが分った。

Table I. Formation of Cyanogen Chloride from Serine and Threonine

Substance (mμ mol.)		KCN equivalence ^{a)} (mμ mol.)	Recovery (%)
DL-Serine	10	9.7	97.0
	20	19.1	95.5
	30	29.4	98.0
	40	39.0	97.5
	50	49.0	98.0
DL-Threonine	15	14.7	98.0
	25	24.5	98.0
	35	34.1	97.4
	45	44.0	97.8

a) Cyanogen chloride produced by oxidation was determined colorimetrically and expressed as KCN equivalence.

β -hydroxyglutamic acid および glucosamine も混合酸化剤で分解されて CICN を生じたが、ここで用いた酸化条件ではセリン、スレオニンに較べて低い値を示した (Fig. 2)。その他のアミノ酸類で CICN を生じる化合物はなかった。グリシンについては Ch-T で分解するとシアニ化カリウムを生成することが報告されている⁴⁾が、この酸化条件では検出されなかった。2-aminoethanol は酸化の温度を 15~30° に上昇させるか、または長時間反応させた場合に CICN の生成が認められた。すなわち混合酸化剤により CICN が生成する反応は 2° 前後では β -hydroxyamino acid および β -hydroxyamino aldehyde に特異的で、温度を上昇させた場合に 2-aminoalcohol 類も分解されることが分った。

セリン、スレオニンからの二酸化炭素の発生は Fig. 3, 4 の如くであった。混合酸化剤の場合同時に CICN が

6) J. T. Cassaday, E. I. Hoegberg. U.S. Pat. 2,575,614(1951) (C. A. 46, 6158d(1952)).

7) S. Skraup: Ann. 419, 65(1919).

8) J. Epstein: Anal. Chem. 19, 272(1947).

9) 畝本: 腐研報 13, 28(1960).

Fig. 2.
Formation of Cyanogen Chloride from β -Hydroxyamino Acid and Glucosamine by the Mixed Oxidizer (Reaction temp.: 2°)

○—○ DL-serine
×---× DL-threonine
△-·-·-△ β -hydroxyglutamic acid
·-·-· gulcosamine

生成されるため、ガス発生量は等 mol 以上になったが、セリン、スレオニンと同量のシアン化カリウムに混合酸化剤を作用させたときに示すガス量を差引くと丁度計算量のガス発生量となった。Ch-T のみでも二酸化炭素は発生するが、反応液中に CICH₃ およびアルデヒドは検出されなかった。混合酸化剤の場合にはアルデヒドと CICH₃ を検出したが、アンモニアは検出できなかった。

そこでセリン、スレオニンを混合酸化剤で分解して生成するアルデヒドを 5,5'-dimethyl-1,3-cyclohexanedi-one (ジメドン) 誘導体とした。セリンから得られた誘導体は mp 191° で methylene bis-methone との混融で融点降下なく、元素分析の結果も一致した。スレオニンから得られた誘導体は mp 142° で、これを硫酸酸性メタノール中で煮沸して得られる無水物は mp 177° でアセトアルデヒドの誘導体であることが確認された。

Fig. 3.
Production of Carbon Dioxide from DL-Serine

Three μ mol. per vessel of DL-serine was oxidized at 30°, pH 5.5, total volume 2.0 cc.

△---△ {Ch-T 10 μ mol.
IO₄⁻ 50 μ mol.
·-·-· Ch-T 10 μ mol.
×---× IO₄⁻ 50 μ mol.
○—○ 3.0 μ mol. of KCN was oxidized with the mixed oxidizer and the readings of manometer was expressed as volume of CO₂ gas.

Fig. 4.
Production of Carbon Dioxide from DL-Threonine
Experimental conditions are the same as Fig. 3.

△---△ {Ch-T 10 μ mol.
IO₄⁻ 50 μ mol.
·-·-· Ch-T 10 μ mol.
×---× IO₄⁻ 50 μ mol.
○—○ the same as Fig. 3.

IO₄⁻ および混合酸化剤でセリンを分解して生成するホルムアルデヒドを chromotropic acid を用いて比色定量した結果は Fig. 5 の如くであった。セリンからは等 mol のホルムアルデヒドが生じた。スレオニンについても混合酸化剤で分解し、生成するアセトアルデヒドを Conway の微量拡散装置を用いて中性の亜硫酸ナトリウム溶液に吸収させ *p,p'*-biphenyl を用いて比色定量したところ、定量的回収を見た。

以上の事実からセリン、スレオニンは混合酸化剤により (4) 式のように分解されることになる。

Fig. 5.

Production of Formaldehyde from DL-Serine

0.4 μmol. of DL-serine was oxidized at 30°.

○-----○ {Ch-T 2.0 μmol.
IO₄⁻¹ 10 μmol.
x-----x IO₄⁻¹ 10 μmol.

Fig. 6.

Production of Formaldehyde from 2-Aminoethanol

0.2 μmol. of 2-aminoethanol was oxidized at 30°.

○-----○ {Ch-T 2.0 μmol.
IO₄⁻¹ 10 μmol.
x-----x IO₄⁻¹ 10 μmol.

なお 2-aminoethanol も 30° で混合酸化剤により分解されると ClCN を生成し、ホルムアルデヒドの生成も Fig. 6 に示す如くであった。したがって 2-aminoethanol もセリン同様 (4) 式のように分解すると考えられる。反応機構としては β-hydroxyamino acid と IO₄⁻¹ との反応の中間体が Ch-T によりクロル化され、α, β 間の C-C 結合が切れると同時に脱炭酸、脱塩酸が起こって ClCN が生成されるものと思われる。

実 験 の 部

試料 β-hydroxyglutamic acid, 1-phenyl-3-methyl-2-pyrazolin-5-one (pyrazolone) は合成品を、セリン、スレオニンは各々 DL 型を、他の化合物は市販品を用いた。また本実験を通じて比色には Coleman Universal Spectrophotometer を使用した。

ガスクロマトグラフィー 島津製 GC-2B 型を用い、分離用カラムとして Dioctyl Phthalate-A (島津製作所) 2 m×0.4 cm を使用した。セリン 0.5 mmol を pH 5.5 の 0.5M 酢酸緩衝液 10 cc に溶かし、これに混合酸化剤 (Ch-T 1.5 mmol+IO₄⁻¹ 4.0 mmol/20 cc, pH 5.5) 20 cc を加えた反応液にヘリウムガスを通気し、10 cc のガスサンプル計量管に導き、充分に通気した後、コックを切換えてガスサンプル計量管中の検体を分離用カラムの回路に導いて分析した。空気、CO₂ および ClCN を同一の条件で各々または混合して分析し、記録紙上の位置を決定した。

2-Aminobenzothiazole の合成 セリン 2.0 g を 150 cc の 0.5M 酢酸緩衝液 (pH 5.5) に溶かし、これに混合酸化剤 (HIO₄·2H₂O 10 g+Ch-T 6 g/200 cc, pH 5.5) 200 cc を加えて充分に冷却し、反応液を攪拌しながら N₂ ガスを通気し、10 cc の BuOH に 1.0 cc の 2-aminothiophenol を溶解した溶液に導いて ClCN を吸収させる。3 hr 後に Et₂O 20 cc を BuOH 溶液に加えて析出する沈殿を集め、Et₂O で洗浄後、これを少量の水に溶解しアルカリ性とする。析出した沈殿を水より数回再結晶して mp 132° の板状晶 400 mg を得た。C₇H₆N₂S Anal. Calcd. C 55.97, H 4.03, N 18.65. Found C 55.76, H 4.08, N 18.59.

Cyanogen chloride の定量法 試料 3.0 cc (5~50 μmol のセリンまたはスレオニンを含む) に pH 5.5

の 0.5M 酢酸緩衝液 0.5 cc を加えて 2° に冷却し、混合酸化剤 (Ch-T 2.0 μmol + IO_4^- 10 $\mu\text{mol}/\text{cc}$ (pH 5.5) 1.0 cc を加えて 8 min 後に 1.0 v/v % チオグリコール酸水溶液 0.5 cc を加え、pyridine-pyrazolone 試薬 (50 v/v % pyridine 水溶液に pyrazolone を 0.5% に溶解) 2.0 cc を加えて 30° で 25 min 後に、別に蒸留水を用いて行なった対照に対して 625 m μ で比色する。

二酸化炭素の測定 ワールブルグのマノメーターを用い、測定には各々の条件について反応液よりセリンまたはスレオニンのみを除いた対照の示すガス量を差引いて発生したガス量とした。

生成したアルデヒドのジメドン誘導体の合成 セリン (またはスレオニン) 0.5 mmol を pH 5.5 の 0.2M 酢酸緩衝液 20 cc に溶解し、氷で 2° 以下に冷却する。これに混合酸化剤 (20 cc あたり Ch-T 1.5 mmol + IO_4^- 4.0 mmol pH 5.5) 20 cc を加え 2~5° で 20 min 後、飽和 KCl 10 cc を加えてはげしく攪拌して IO_4^- を沈殿させる。これを濾過し、沈殿を冷水 20 cc でよく洗い、洗液を合わせてさらに溶存する IO_4^- を NaHSO_3 溶液を加えて分解し、これに 0.5% ジメドンの温水溶液 150 cc を加え、時々はげしく攪拌しながら 3 日間放置、生じた沈殿を集めて dil EtOH から再結晶する。セリンの場合には mp 191° の結晶 122 mg を得た。C₁₇H₂₄O₄ Anal. Calcd. C 69.83, H 8.27. Found C 69.40, H 8.22. スレオニンの場合には mp 142° の結晶 131 mg を得た。C₁₈H₂₆O₄ Anal. Calcd. C 70.56, H 8.55. Found C 70.87, H 8.54.

ホルムアルデヒドの定量 試料 1.0 cc (HCHO として 0.1~0.4 μmol にあたる検体を含む) に pH 5.5 の 0.5M 酢酸緩衝液 0.5 cc を加え、これに 1.0 cc の酸化剤 (IO_4^- のみの場合には 10 μmol , 混合酸化剤の場合には IO_4^- 10 μmol と Ch-T 2.0 μmol を含む) を加え、所定の時間後に 1.2% NaHSO_3 0.5 cc を加えて反応を止める。つぎに 2NH₂SO₄ に 2% に chromotropic acid を溶解した試薬 0.5 cc を加え、水冷しながら conc H₂SO₄ (GR) 4.0 cc を静かに積層し、はげしく攪拌してから 30 min 沸騰水浴中に置き、水冷後 2.5% チオ尿素 2.0 cc を加えて混和し、570 m μ で蒸留水を同様に処理して得た対照に対して比色する。

アセトアルデヒドの定量 Conway の微量拡散装置 (No. 1) の内室に pH 7.0 に調整した 3% Na₂SO₃ 1.0 cc を入れる。外室には試料 0.5 cc (スレオニンまたはアセトアルデヒド 0.1~0.3 μmol を含む) をとり、これに 0.5M 酢酸緩衝液、pH 5.5 および混合酸化剤 (0.5 cc あたり Ch-T 2.0 μmol + IO_4^- 10 μmol pH 5.5) をそれぞれ 0.5 cc 加えて直ちに蓋をして室温 (10~15°) で 6 hr 放置する。つぎに内室より 0.5 cc を試験管にとり、蒸留水で全量を 1.0 cc とし、これに 4% CuSO₄ 1 滴を加え、氷水で冷却しながら conc H₂SO₄ (GR) 6.0 cc, 1.5% *p,p*-biphenol 水溶液 (4% NaOH に溶解) 0.2 cc を加えよくふりまぜて 30~37° で 30min 放置後、沸騰水に 90 sec つけ、冷対照に対して 580 m μ で比色する。

本研究を実施するにあたり、終始御指導を頂いた 宮木高明教授、林 誠助教授、 β -hydroxyglutamic acid を合成していただいた 池田仁三郎助教授に深く感謝します。また元素分析をしていただいた京都大学元素分析センター、ならびに東亜栄養研究所に深謝します。