ジアセチル-グアニジノ化合物- α -ナフトール系から生成する Voges-Prosakuer 反応呈色物質の分離と性状¹⁾

坂口 武一, 田辺 信三, 小屋原 伊一郎, 井上 保
千葉大学薬学部²⁾

Separation and Property of Pigments produced by Voges-Proskaue Reaction of Diacetyl-Guanidino Compounds- α -Naphthol System¹⁾

TAKEICHI SAKAGUCHI, SHINZO TANABE, IICHIRO KOYAHARA and TAMOTSU INOUE
Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chiba University²⁾

(Received July 2, 1970)

Two pigments(A and B) produced by Eggleton's method from diacetyl-guanidino compound- α -naphthol system were separated by thin-layer chromatography over alumina or silica gel and benzene:methanol(9:1) or benzene:ethyl acetate:ethanol(3:1:1). A and B showed color reaction similar to that of Voges-Proskaue(V-P) reaction in alkaline medium, whereas in the acid medium, color of A was faint red, while that of B was yellow, which was the same as that of V-P reaction in acid medium. Apparent color development in the solutions of various pH except alkaline medium, seems to be dependent on the quantity of component B. B is considered as the main product of this reaction. Another pigment (C) was separated from the colored solution obtained by O'Meara's method. C is considered to be a different from A and B pigment from its absorption spectrum.

初め, *E. coli* と *A. aerogenes* 菌の鑑別に用いられた Voges-Proskaue 反応 (以後 V-P 反応とする. ペプトン培養液中で, 40% KOH 溶液を加えると, *A. aerogenes* 菌は紅色を呈する) は, その後細菌の代謝によってできるジアセチルがグアニジノ基と反応して紅色を呈する反応であることがわかった. そこで O'Meara は反応媒体中にクレアチンを加えることによって一層 V-P 反応の感度が上り, 鑑別もより正確となることを見出した (O'Meara 法³⁾). その後 Barritt⁴⁾ がクレアチンの他に α -ナフトールを加えることによって, O'Meara 法よりも数段と感度が上ることを発見し, これを Eggleton が分析分野にも応用して V-P 反応の改良型とした (Eggleton 法⁵⁾).

このように V-P 反応ではジアセチル-グアニジノ化合物系による O'Meara 法とジアセチル-グアニジノ化合物- α -ナフトール系の Eggleton 法があり, 両法ともアルカリ性で紅色を呈する共通点をもっている.

しかし両法による呈色物質の構造および呈色メカニズムの比較についてはなんら報告はなかった.

著者らは前報で¹⁾ V-P 反応呈色物質の構造決定の一環として, 両法の反応メカニズムの比較を吸収スペクトルによって検討した結果, アルカリ溶液中で, O'Meara 法による呈色溶液は Eggleton 法に比べ各グアニジノ化合物においてそれぞれ 15—10 m μ 低波長に $\lambda_{\max}$ をもち, かつ O'Meara 法ではアルカリ濃度によって呈色溶液の $\lambda_{\max}$ および吸光度が変化し, 濃厚アルカリ溶液 (最終濃度で 28% NaOH 濃度) 中のとき最高の感度を示し, Eggleton 法と同じ濃度のアルカリ溶液中 (6% の希薄アルカリ溶液) では 405 m μ と 500 m μ 台とに 2 つの $\lambda_{\max}$ を示し, 呈色強度は濃厚アルカリ溶液中にくらべて約 1/7 であることがわかった. それに対して Eggleton 法ではアルカリ濃度には関係なく, 呈色強度は α -ナフトールの濃度に依存することがわかり (最終濃度で 3%), 少なくとも反応溶液中では, 呈色物質の性状および反応メカニズムは, O'Meara 法と Eggleton 法では異なるも

1) 日本分析化学会第 17 年会に一部発表, 広島, 1968 年 10 月.

2) Location: 1-33 Yayoi-cho, Chiba-shi.

3) R.A.Q. O'Meara, *J. Pathol. Bacteriol.*, **34**, 401 (1931).

4) M.M. Barritt, *J. Pathol. Bacteriol.*, **42**, 441 (1936).

5) P. Eggleton, S.R. Elsdon, N. Gaugh, *Biochem. J.*, **37**, 526 (1943).

のであることがわかった。

また Eggleton 法で得られる呈色溶液を酸で中和することによって粗沈殿物質が簡単に得られることが以前から知られている。⁵⁾ そこで今回は以前著者らの研究で,⁵⁾ Eggleton 法ではジアセチルに対してグアニジノ化合物のみが V-P 反応を陽性にすることを報告したので、その中でグアニジン塩酸塩 (I), メチルグアニジン硫酸塩 [II], および 1,1-ジメチルグアニジン硫酸塩 (III) を使って, Eggleton 法によってできる呈色物質を分離し, 分離された各呈色物質につきその性状を吸収スペクトルによって検討した結果, 溶液の pH によって異なったスペクトル変化を示す 2 種の色素ができることがわかった。

また化合物 (III) を用いて Eggleton 法, O'Meara 法によって生成する色素を比較したところ共通する色素を生成しなかった。

実験の部

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 型を使用し, 吸光度測定には, 日立 101 型スペクトロメーターを使用した。

pH 測定には, 日立-堀場 M-5 型 pH メーターを使用した。

試薬 塩酸グアニジン, ジアセチル, α -ナフトールは試薬特級を使用した。

1-メチルグアニジン硫酸塩——文献記載⁶⁾の方法で合成した。mp 237.5°。

1,1-ジメチルグアニジン硫酸塩——前報¹⁾参照。

薄層担体——アルミナ B-5 (和光社製), シリカゲル B-5 (和光社製) を使用した。

展開溶媒——ベンゼン, メタノール, エタノール, 酢酸エチルはすべて試薬特級を使用。

6% Stock Alkali 溶液——試薬特級の NaOH 30 g と試薬特級の Na_2CO_3 80 g を水でとかし, 全量を 500 ml とする。

1N NaOH, 0.1N NaOH 溶液——試薬特級 NaOH を使って調製した。

pH 7 溶液——0.1N KH_2PO_4 (試薬特級) 溶液を調製し, pH メーターを使い, 0.1N KOH 溶液 (試薬特級) で pH 7 に調節した。

pH 1 溶液——蒸留水に 1N 塩酸 (試薬特級) を加えて pH を調節し, pH メーターで検定した。

操作法 各液性における呈色溶液の吸収スペクトルの測定——各グアニジノ化合物 10 $\mu\text{M}/\text{ml}$ 溶液 1 ml とジアセチル溶液 20 $\mu\text{M}/\text{ml}$ を 1 ml とり, 3% α -ナフトールの stock alkali 溶液 2 ml を加え, 水で 10 ml とし, 30 分後 1N 塩酸で pH 7 に調節し, 生成する沈殿を遠心分離し, 分離された粗呈色物質をエタノールで適量にとかし, この 0.5 ml を取り, 0.1N NaOH, pH 7, pH 1 の各溶液で全量 5 ml とし, 吸収スペクトルを測定した。

TLC (薄層クロマトグラフィー) 分離による呈色物質の分離と各成分の吸収スペクトルの測定——Eggleton 法: 各グアニジノ化合物 5 $\mu\text{M}/\text{ml}$ 溶液を各 1 ml, 0.05% ジアセチル溶液を 2 ml とり, 1% α -ナフトールの stock alkali 溶液 2 ml を加え, 水で全量 10 ml とする。30 分後 1N 塩酸で pH 7 に中和し, 酢酸エチルで反応物を抽出する。この抽出液をキャピラリーでアルミナまたはシリカゲルプレートに線状にプロットし, 良く乾燥してから, アルミナを用いたときにはベンゼン-メタノール (9:1) で, シリカゲルを用いたときは, ベンゼン-酢酸エチル-エタノール (3:1:1) で展開し, 分離した A, B の各成分をミクロスパーテルでかきとり, これを 3 回くり返し, 各かきあつめた成分をエタノール 0.5 ml で抽出し, この中に各液性溶液 4.5 ml を加え, 良く振とうし, 遠心分離をおこない, 担体と抽出溶液を分離し, 抽出溶液につき各々吸収スペクトルを測定した。

O'Meara 法: 1,1-ジメチルグアニジン溶液 0.5 ml (10 $\mu\text{M}/\text{ml}$) と 10 $\mu\text{M}/\text{ml}$ ジアセチル溶液 1 ml をとり, 40% NaOH 溶液で全量 5 ml とし, 30 分後 *n*-ブタノールで呈色物質を抽出し, Eggleton 法と同様の操作でアルミナ TLC で分離し, 認められたスポット (C 成分) を, 同様にエタノールで抽出し, 各液性溶液を加えて, 吸収スペクトルを測定した。

Eggleton 法による A 成分と B 成分の存在量——20×20 のアルミナプレートをを用い, TLC 分離による吸収スペクトルの測定と同じ方法で, 粗沈殿を得る。これを 1 ml のエタノールにとかし, 各エタノール溶液をキャピラリーで一定量ずつ線状に 3 ケ所プロットし, ベンゼン-メタノール (9:1) の溶媒で, A, B 成分をそれぞれ集め, 1N NaOH 溶液を 5 ml 正確に加え, 各フラクションを抽出し, 遠心分離によって抽出液を分離し, 3 ケ所にプロットした各 A, B アルカリ抽出液につき, グアニジン塩酸塩 (I), 1-メチルグアニジン硫酸塩 (II) については 525 $\text{m}\mu$, 1,1-ジメチルグアニジン硫酸塩 (III) については 535 $\text{m}\mu$ の波長における A, B 成分の吸光度を測定し, その比を求めて存在率とした。

6) T. Nishimura, S. Tanabe, H. Tokuyama, T. Kono, Y. Sakabe, T. Sakaguchi, *Chem. Pharm. Bull.* (Tokyo), 17, 639 (1969).

結果および考察

[I] Eggleton 法による V-P 反応呈色物質の薄層クロマトグラフィーによる分離

Eggleton 法による呈色物質はアルカリ性ではほとんどの有機溶媒に抽出されない。わずかに *n*-ブタノール、酢酸エチルで抽出されるにすぎなかった。しかし反応溶液を酸で中和すると、3 種のグアニジノ化合物からいずれも青紫色の沈殿が生じ、それは酢酸エチルでほとんど完全に抽出された。それでこの抽出溶液について、アルミナとシリカゲル担体の TLC で分離をおこなった。

Fig. 1. Separation of the Pigments of the V-P Reaction on the TLC

- I: guanidine hydrochloride
 II: 1-methylguanidine sulfate
 IIIa, IIIb: 1,1-dimethylguanidine sulfate
 IIIa: by Eggleton's method
 IIIb: by O'Meara's method
 (a) Alumina (Wako B-5), developing solvent: benzene-MeOH (9:1)
 (b) Silica gel (Wako B-5), developing solvent: benzene-AcOEt-EtOH (3:1:1)

その結果を Fig. 1a, 1b に示す。

Fig. 1a は、担体としてアルミナを、展開溶媒として、ベンゼン-メタノール (9:1) を使用したときの結果で、Fig. 1b は担体としてシリカゲルを、展開溶媒として、ベンゼン-酢酸エチル-エタノール (3:1:1) を使用したときの結果である。

なお Eggleton 法の呈色物質と比較する目的で O'Meara 法で得られた呈色溶液の *n*-ブタノール抽出液について、Fig. 1a, 1b と同じ方法で TLC をおこなった。使用した化合物はグアニジノ化合物中一番感度が良かった N,N-ジ置換体のなかで III を用い、Eggleton 法によって呈色させた場合を IIIa, O'Meara 法で呈色させた場合を IIIb として、Fig. 1a, 1b に示した。

Fig. 1a, 1b の結果より、Eggleton 法による I, II, IIIa の化合物によってできる呈色物質は、A, B の 2 成分であることがわかった。この A, B 2 成分中、A 成分は I, II, IIIa いずれの場合にも紫赤色のスポットを示し、Rf 値は I, II, IIIa

よりアルミナで、0.93, 0.97, 0.99, シリカゲルで 0.59, 0.63, 0.76 をそれぞれ示し、B 成分は赤色のスポットを示し、Rf 値はアルミナで 0.13, 0.22, 0.23, シリカゲルで 0.37, 0.52, 0.62 をそれぞれ示した。

また目視的にみて、B 成分の方が A 成分より多量にあるようにみえた。IIIb で示した III による O'Meara 法の *n*-ブタノール抽出液からは Fig. 1a, 1b と同じ溶媒で、それぞれ A, B 成分とは異なる成分 (C) が橙赤色スポットに分離され、アルミナで Rf 0.90, シリカゲルで Rf 0.71 を示し、この方法では C 成分の他に A, B 成分と一致するスポットは得られなかった。この結果より、前報で指摘したように Eggleton 法と O'Meara 法とはできる呈色物質は異なることがはっきりした。

[II] TLC 分離によって得られた A, B, C 各成分の可視部吸収スペクトルに対する pH の影響

Eggleton ら⁵⁾ および前報¹⁾ で Eggleton 法による V-P 反応呈色溶液は、アルカリ性、中性、酸性で色が変化することがわかっているため、TLC 分離によって得られた A, B, C 各成分のスポットを集め、0.1N NaOH 溶液、pH 7, pH 1 の溶液でそれぞれ抽出をおこない可視部吸収スペクトルの相異を調べた。なお吸収スペクトルの比較として Eggleton 法によって得られた呈色溶液を中和し、生じた沈殿を遠心分離し、沈殿を集め、これをエタノールにとかし、このエタノール溶液に 0.1N NaOH, pH 7, pH 1 の各溶液を加え呈色させて可視部吸収スペクトルを測定した。その結果を Fig. 2, 3, 4, 5 に示す。

Fig. 2—4 より、I, II, IIIa とともに TLC より分離された A, B 成分および V-P 反応呈色溶液から得られた粗呈色物質とも 0.1N NaOH のアルカリ溶液中では、I で 525 m μ , II で 525 m μ , III で 535 m μ とほぼ同一の $\lambda_{\max}$ を示した。pH 7 の場合、I の粗呈色物質と B 成分は 555 m μ に、A 成分は 560 m μ に、II では粗呈色物質と B 成分が 565 m μ , A 成分が 560 m μ , IIIa では粗呈色物質と B 成分が 565 m μ , A 成分が 570 m μ にそれぞれ $\lambda_{\max}$ を示し、赤紫色を呈する。そして pH 7 の領域で A 成分と B 成分に、わずかに $\lambda_{\max}$ の違いがみられ、粗呈色物質と B 成分が同じ $\lambda_{\max}$ を示している。

一方 pH 1 では、A 成分と B 成分とは大きな相異を示した。すなわち I では、粗呈色物質は 450 m μ , B 成分も 450 m μ に $\lambda_{\max}$ を示すのに対して、A 成分は 560 m μ に $\lambda_{\max}$ を示し、それぞれ黄色、赤紫色を呈する。

[II] でも同様に粗呈色物質と B 成分は $450\text{ m}\mu$, A 成分は $510\text{ m}\mu$ に λ_{max} を示し, 黄色, および赤色を呈する.

また [IIIa] では, 粗呈色物質, B 成分とも $455\text{ m}\mu$, A 成分は $410\text{ m}\mu$ と $500\text{ m}\mu$ に 2 つの λ_{max} をもち, 黄色と赤色を示す.

このように pH 1 で粗呈色物質と B 成分は, アルカリ溶液のときにくらべて, $75\text{--}80\text{ m}\mu$ 短波長側にシフトするのに対して, A 成分は同じ波長が $10\text{--}30\text{ m}\mu$ 短波長にシフトしている.

これらの結果より, [I], [II], [IIIa] のグアニジノ化合物において, B 成分が粗呈色物質の各液性溶液と一致した挙動を示していることより, Eggleton 法による V-P 反応呈色物質として B 成分の方が A 成分より多く主成分であると考えられる.

また A 成分は pH 7 において, B 成分にない吸収を $380\text{ m}\mu$ 付近と $400\text{ m}\mu$ 付近と特長的に示すが, この吸収はアルカリ性および酸性で消える.

なお各 pH 溶液における粗呈色物質の λ_{max} における吸光度の変化をみると, 0.1N NaOH 溶液にくらべ, 吸光度は pH 7 で約 $\frac{1}{2}$ に, pH 1 では約 $\frac{1}{5}$ に低下している.

次に Fig. 5 に示した O'Meara 法によって得られた C 成分の各液性における吸収スペクトルの変化をみると, 0.1N NaOH 溶液では $405\text{ m}\mu$ と $515\text{ m}\mu$ に 2 つの極大吸収を示し, pH 7 では $520\text{ m}\mu$, pH 1 では $460\text{ m}\mu$ にのみ λ_{max} を示している. そしておのおの橙赤色, 赤橙色, 黄色を示した.

この変色からみても C 成分は, A, B 両成分と一致した極大吸収を示さず, Fig. 4 のアルカリ性における吸収スペクトルと比較しても A, B 成分とは違うことがわかる.

この C 成分の吸収スペクトルにおいて, アルカリ溶液中で時間とともに $515\text{ m}\mu$ の吸収が減少して, それに比例して $405\text{ m}\mu$ の吸収も減少し, 前報¹⁾ で示した O'Meara 法の希薄アルカリ溶液中の吸収スペクトルと一致した.

Fig. 2. Absorption Spectra of the Pigments obtained from Guanidine (I) in Various pH (Eggleton's Method)

—○—: 0.1N NaOH —△—: pH 7 —●—: pH 1
(a) pigments extracted from the spots of TLC
(b) colored solution

Fig. 3. Absorption Spectra of the Pigments obtained from 1-Methylguanidine (II) in the Various pH (Eggleton's Method)

—○—: 0.1N NaOH —△—: pH 7 —●—: pH 1
(a) pigments extracted from the spots of TLC
(b) colored solution

Fig. 4. Absorption Spectra of the Pigments obtained from 1,1-Dimethylguanidine (IIIa) in the Various pH (Eggleton's Method)

—○—: 0.1N NaOH —△—: pH 7 —●—: pH 1
(a) pigments extracted from the spots of TLC
(b) colored solution

Fig. 5. Absorption Spectra of the Pigments extracted from the Spots of TLC in Various pH (O'Meara's Method) (IIIb)

—○—: 0.1N NaOH —△—: pH 7 —●—: pH 1

すなわち前報で希薄アルカリ溶液 (6% NaOH) 中で、ジアセチルとグアニジノ化合物と反応させると、橙赤色を呈し、吸収スペクトルをとると 405 mμ と 515 mμ に $\lambda_{\max}$ を示した。このうち 405 mμ の吸収は、ジアセチルの希薄アルカリ溶液中での反応でも得られる。しかしジアセチル自身の反応では時間とともに 405 mμ の吸光度が増大してゆくのにに対して、ジアセチルとグアニジノ化合物との反応では、反応開始後約 10 分間で 405 mμ および 515 mμ の吸光度は最高に達し、それ以後は退色が始まる。前報における検討において、O'Meara 法における 405 mμ の吸収

はジアセチル自身の吸収ではなく、グアニジノ化合物との反応によりできた反応物質による吸収であろうと予想していたが、C 成分の単離と上記の C 成分の性状の検討結果からこの点がたしかめられた。

そしてこの C 成分は Eggleton 法と同じ濃度の希薄アルカリ溶液中でも得られた。

[III] Eggleton 法による A, B 両成分の存在量

グアニジノ化合物 (I), (II), (III) の各粗呈色物質のエタノール溶液をアルミナ TLC で分離し、A, B 両成分のスポットをかきあつめ、1N NaOH 溶液で抽出し、I, II, については 525 mμ, III については 535 mμ の波長で A/B の吸光度比を求めたが、3 回の実験での値が一定にならなかった。しかし大体の傾向としては、B 成分の吸光度が A 成分のそれに比べて、N,N-ジ置換グアニジンの III では 3—5 倍、N-モノ置換体の II, グアニジン自身の I で 1.5—2 倍であった。

一定の値が得られなかった原因としては、操作過程で試料を多量にプロットすると原点と B 成分の下に青色および褐色のバンドが共通して得られ、これが値をばらつかせたと考えられる。

以上の結果より、Eggleton 法による V-P 反応呈色物質は N,N-ジ置換グアニジン、N-置換グアニジンおよびグアニジンとも A, B の 2 成分であることがわかった。しかしこの結果は先に新島ら⁷⁾によるジアセチル、アルギニン、 α -ナフトール系の呈色物質が 1 成分であったとの報告とは異なっている。

またこの A, B 2 成分はアルカリ溶液中で同じ $\lambda_{\max}$ を与えるが、酸性でまったく違った色を示し、V-P 反応呈色溶液と同じ挙動を示したのは B 成分の方であった。

A 成分と B 成分の安定性を比較すると、A 成分の方が安定で、B 成分は薄層上で、スポットのままで放置しておくと退色が早く再び展開すると褐色のスポットが新たにあらわれてくる。

7) 新島邦広, 奥山典生, 生化学, 35, 396 (1963).

ジアセチル, グアニジノ化合物による O'Meara 法からは橙赤色の C 成分しか分離できなかったが, この物質も同様に不安定で, 空気中に放置しておくと徐々に褐色に変化していく.

しかし Eggleton 法で A, B の 2 成分の色素を分離することができたので次報に, この物質の構造について発表する予定である.