九州大学学術情報リポジトリ
Kyushu University Institutional Repository

尿素化合物の薄層クロマトグラフィー

大村，浩久
九州大学農学部食糧化学教室

小野，泰道
日本新薬株式会社

水上，浩明
江崎グリコ株式会社

https://doi.org/10.15017/22978

出版情報：九州大學農學部學藝雜誌. 22 (4), pp.325-329, 1966-12. 九州大學農學部
バージョン：
権利関係：

第22巻 第4号　九州大学農学部学芸雑誌　昭和41年12月

尿素化合物の薄層クロマトグラフィー*

大村浩久・小野泰道†・水上浩明‡

Thin layer chromatography of urea compounds

Hirohisa Omura, Yasumichi Ono
and Hiroaki Mizukami

尿素およびその誘導体も窒素源として植物や微生物に広く同化利用されることはよく知られているが，これは土壌中ないし培養されている微生物のウレアーゼ作用によつてアンモニアを生じ，これが植物の生育や微生物の増殖に利用されるといわれている．さらに動物においても，たとえば乳牛などで尿素を飼料に混合して与えると有効であることが知られている．しかしこの尿素類の動物に対するいわば食糧的効果は主として反芻動物に限られており胃の内部で尿素から生じたアンモニアが共棲している微生物の増殖に利用され，その菌体が寄主動物によつて同化されると考えられている．しかし一般にこれらの植物ないし微生物のウレアーゼ活性と尿素の窒素源としての有効性とを広く比較検討するとき，必ずしもこのことだけで説明出来るとは思われない場合もしばしば認められる．[3]

これまでも述べてきたように我々は NAD ないし NADP が尿素の存在下に酵素的に還元されることを見出し，さらにその諸性質を検討した結果反応に関与する酵素は尿素脱水素酵素であると推定した．[5,6] これは種々の動植物組織に含まれており，$NADH_2$ あるいは $NADPH_2$ の生成とともに若干の尿素化合物も生成されることが ^{14}C-尿素を用いる研究によつて確められた．[7] しかもその生成量は共存するウレアーゼ活性の低い程多いことが明らかにされ生体内における尿素の利用に何等かの関連をもつものと想像された．[2] しかしこの尿素化合物は現在までのところ同定されておらず，しかも酵素の性質とくに反応系における尿素の最適濃度が比較的に低く基質阻害を起すことなどから生成物を多量に集積させることはむつかしく，その探索にはカラムないし濾紙クロマトグラフィーなどによることが必要である．尿素類の濾紙クロマトグラフィーについては足立[1]によつて報告されているがその最低検出量は 5 μg であるといわれている．しかし最近 Stahl 等[8]によつて考案改良された薄層クロマトグラフィーはその分離能がよいうえに検出量の限界も低くしかも操作が迅速なことなどから急速に普及し，糖類，アミノ酸類をはじめ種々の物質について広く利用されるようになつているので尿素類についても検討した．

実験方法

実験には東洋科学産業株式会社製薄層クロマトグラフ装置 HC-20 型（標準型）を用いた．Merck 製薄層クロマトグラフィー用シリカゲル G (Kieselgel G nach Stahl ; Silicagel G acc. to Stahl) を常法に従い 20 cm×20 cm ガラス板上に厚さ 0.3 mm の薄層を調製し展開に用いた．

尿素類の検出には Ehrlich 試薬を用いた．パラジメチルアミノベンズアルデヒド市販特級品 1 g をエチルアルコール 30 ml にとかし，これに濃塩酸 30 ml を加える．さらにこの溶液にブチルアルコール 200 ml を加えて調製した．これを展開した試料の薄層に噴霧し 110°C に 10 分間加熱し黄色のスポットとして検出した．濾紙の場合には強酸性，高温のため数分しか加熱出来ない．

尿素脱水素酵素の試験とくに生成物を検索するためには基質として主に ^{14}C-尿素を使用した．[7] この場合 ^{14}C-化合物の検索はオートラジオグラフィーによつて行なつた．常法によつて展開したのち室温に放置して乾燥させ，薄層の崩解を防ぐためにサランラップのようなものでその表面を被い，これに医療用ないし工業用X線フィルムを直接接触して感光させた．接触期間は勿論放射能の強さにもとづくが通常 10 日間とし，常法により現像した．

* 尿素の同化に関する酵素的研究（第6報）

† 勤務先：日本新薬株式会社
‡ 勤務先：グリコ株式会社

Table 1. Rf values for several urea compounds by some solvents.

Solvent	I	II	III	IV
Distance ascended (mm)	112	115	100	110
Time (minutes)	110	110	90	90
Urea	0.53	0.68	0.83	0.30
Biuret	—	—	0.88	—
Monophenylurea	0.71	0.93	0.97	0.80
Ethyleneurea	0.37	0.87	0.81	0.23
Nonamethylurea	0.60	0.84	0.95	—
Isobutylindendiurea	0.52	0.80	0.83	0.26
Uraform	0.35, 0.43, **0.50**	0.67	0.73	0.19, **0.32**

Solvent examined
I n-Butylalcohol : acetic acid : water 3 : 1 : 1
II Phenol : water 3 : 1
III iso-Propylalcohol : formic acid : water 7 : 1 : 2
IV Amylalcohol saturated with water

結果および考察

展開溶媒

尿素のほかにビューレット，モノフェニール尿素，エチレン尿素，ノナメチル尿素，イソブチリンデンジ尿素およびウラホルムの各水溶液について種々の溶媒を用いて室温において上昇法により展開しその Rf 値を求めた．展開溶媒としてはブチルアルコール：酢酸：水 (3：1：1)，フェノール：水 (3：1)，イソプロピルアルコール：ギ酸：水 (7：1：2) および水飽和アミルアルコールを用いたが第1表に示すように約 10 cm の展開に室温で 100 分前後を要し各化合物の相互分離も比較的に良かつた．

ここでとくにウラホルムでは1ないし3のスポットが検出された．これは実験に用いた試料が肥料用のものであつて 1-メチレン-2-尿素および 2-メチレン-3-尿素も不純物として含まれているためであると考えられる．この場合発色の最も濃いものが目的のスポットであつて Rf は 0.50 (溶媒 I) および 0.32 (溶媒IV) である．この点からいつても，また供試した各誘導体の相互の分離能からいつてもブチルアルコール：酢酸：水が最もよく，ついで水飽和アルミアルコールであるということが出来る．

尿素の検出量

次に尿素の検出可能な限界量を知るために 0.1 μg ないし 20 μg をスポットしブチルアルコール：酢酸：水 (3：1：1) を用い室温 (約 30°C) で 65 分間上昇展開し乾燥後 Ehrlich 試薬で発色させた．

Table 2. Detection of urea by Ehrlich's reagent on thin layer chromatogram.

Amounts of urea, (μg)	0.1	0.5	1.0	2.0	5.0	10.0	15.0	20.0
Detection	±	±	+	+	+	+	+	+

+ : clearly detectable ± : vaguely detectable

尿素の量が 1 μg 以上では Rf 0.53～0.54 の位置に明瞭な黄色スポットが検出された．これに対して 0.1 μg または 0.5 μg でもごく淡い黄色スポットが認められ尿素単独の場合には検出が可能であると思われる．濾紙の場合には 5 μg であるが，これは試薬噴霧後薄層では充分に加熱出来るのに濾紙では制限されるためであると推定される．

濾紙クロマトグラフィーとの比較 (応用例)

尿素脱水素酵素による尿素からの生成物を検索する場合カラムおよび濾紙クロマトグラフィーが比較的に有効な手段であることは既に示したとおりである．[7]

尿素を窒素源として古谷[2] の報告に従つて砂に栽培した青シソの新鮮な葉 40 g から常法に従い M/30 燐酸緩衝液 (pH 7.2) でガラス粉末とともに乳鉢中で磨砕，35°C で 30 分抽出し 6,000 r.p.m. 10 分間遠心分離して抽出液を調製した．これから −10°C でアセトン分別を行い 33 %ないし 55 %で沈澱する区分を冷却水にとかし流水透析後 M/5 トリス緩衝液 (pH 7.5) 55 ml を加え 10 KC の音波で 10 分間処理し最後に 10,000 r.p.m. で 10 分間遠心分離して 220 ml の酵素液を調製した．この酵素液 70 ml に NADP 30 mg, ATP 70 μmoles, $MgCl_2$ 50 μmoles, オルニチン 20 μmoles, PO_4 750 μg, FAD 1 mg, ^{14}C-尿素 20 μCi を加え水で全量 100 ml とし 30°C に 60 分間作用させた．これに活性化した結晶ウレアーゼ溶液 (mg/ml 5 %アルブミン) 5 ml を加え 40° ないし 45°C に 30 分間放置して残存する ^{14}C-尿素を除いた．さらに 10 %トリクロール酢酸 5 ml を加え 75°C に 5 分間加熱して蛋白を沈澱させ遠心分離した．こうして得た反応液を既述の方法で

Dowex 50×8（200～400メッシュ）樹脂に吸着させ，水—0.1M 燐酸緩衝液（pH 6.8）で濃度勾配溶出を行なつた．この原液（3201 cpm/ml）および樹脂処理液（1331 cpm/ml）についての濾紙クロマトグラムおよび薄層クロマトグラムを第1図に示す．

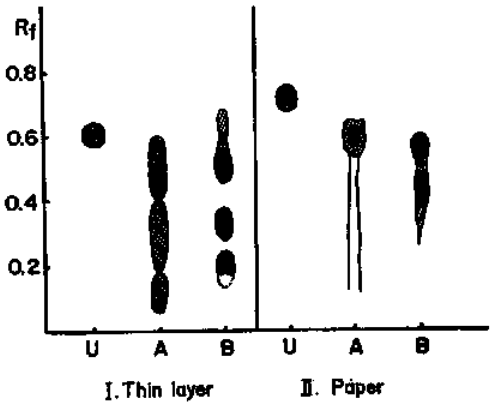

Fig. 1. Autoradiograms of reaction mixture of urea dehydrogenase.
U: urea; A: original reaction mixture; B: reaction mixture treated with Dowex 50×8.

原液を直接展開した場合その分離は不充分であつて樹脂処理が必要なことは明らかであるが，さらに分離能は薄層が濾紙よりもすぐれている．

次に尿素を種々の試薬で処理した場合どのような変化を受けるかも検討した．この場合も生成物が明らかでないので検出試薬を選ぶことは出来ない．そのため ^{14}C-尿素を用いることとし下記に示すように処理したのち，オートラジオグラフィーによつて検出した．英国 Radiochemical Centre 製 ^{14}C-尿素の水溶液（0.01 mCi/ml）0.01 ml に水 1 ml を加えて試料とし定性的に次のように処理した．

1）未処理

2）数 mg のパラジメチルアミノベンズアルデヒドを試料溶液に溶解し，さらに 1 N 苛性ソーダ 10 滴を加えてアルカリ性とし 10 分間加熱した．この処理によつて液は白濁した．

3）数 mg のニンヒドリンを加え加熱した．

4）少量の亜硝酸ソーダを溶解しさらに 0.1 ml 氷酢酸を加えて酸性とし同様に加熱した．

5）少量のフェリシアン加里および 1 N 苛性ソーダ 5 滴を添加して室温に放置した．

6）少量のニトロプルシッドソーダをとかし 1 N 苛性ソーダ 5 滴によつてアルカリ性とし同様に室温に放置した．

7）少量の過マンガン酸加里および濃塩酸を加えて加熱，冷却後苛性ソーダを滴加して中和，さらにチオ硫酸ソーダを加えると液は緑変し赤褐色の沈澱を生じたのでこれを遠沈除去した．

8）数滴のヨード氷酢酸溶液を添加し加熱する．流水で冷却したのちチオ硫酸ソーダで過剰のヨードを除去した．

これらをそれぞれ試料皿に移し赤外線ランプで加熱乾涸したのち GM カウンターで残存する放射能を計測した．さらにそれぞれ水を 0.1 ml 宛加えて乾涸物をとかし，ブチルアルコール：酢酸：水を用いて濾紙および薄層で展開しオートラジオグラムを求めた．それらの結果を第3表および第2図に示す．

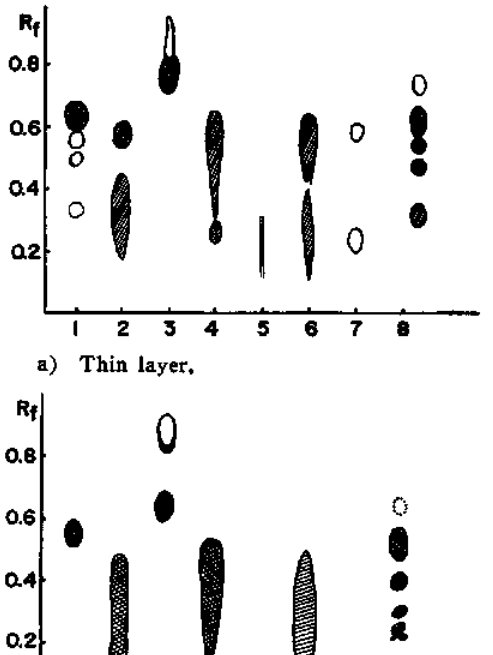

Fig. 2. Autoradiograms of urea and reaction products by some chemical procedures. Samples were indicated in Table 3.

ここでとくに2～3の点が指摘される．試験に用いた ^{14}C-尿素は日本放射性同位元素協会を通じて英国 Radiochemical Centre より入手したもの（CFA 41, Urea-C^{14}, Batch 24）であつて Jezdic, Rajnvajn[4] により記載された方法によつて調製され結晶化により精

Table 3. Remaining radioactivity after treating ^{14}C-urea by several procedures.

Sample	1	2	3	4	5	6	7	8
Radioactivity (c. p. m.)	12318	6612	9777	2604	9341	10831	3741	14054

A mixture of 0.01 ml of ^{14}C-urea solution (0.01 mCi/ml) and 1 ml of H_2O was treated by one of the following procedures and the remaining radioactivity of the resulting mixture was estimated by a GM counter after drying the solution under an ultrared lamp in a planchet.

1) Urea solution was not treated and employed as reference.

2) A few mg of p-dimethylaminobenzaldehyde and 10 drops of 1 N NaOH were added into the sample solution and the mixture was heated for 10 minutes.

3) A few mg of ninhydrin was added and the mixture was heated.

4) A few mg of $NaNO_2$ and 0.1 ml of glacial acetic acid were added and the mixture was heated.

5) A few mg of potassium ferricyanate and 5 drops of 1 N NaOH were added and the mixture was kept for a while at room temperature.

6) The sample solution was treated with sodium nitroprusside and NaOH as 5).

7) A few mg of potassium permanganate and one drop of conc. HCl were added and the mixture was heated. After neutralizing the mixture with NaOH, sodium thiosulfate was added dropwise to remove excess permanganate. Reddish brown precipitate formed was centrifuged off.

8) A few drops of iodine in glacial acetic acid solution was added and heated. Excess iodine was removed by sodium thiosulfate after rapid cooling of the mixture with running tap water.

Into planchet, each 0.1 ml of H_2O was added after counting and precipitates were dissolved. The solution obtained were subjected to paper and thin layer chromatographies with a butyl alcohol : acetic aicd : water system.

製されたものである．これを凍結乾燥標品として窒素ガスの封入下にパイレックスガラスアンプル内にシールして提供された．1963年4月に分析されたデーターによると比放射能は23.6 mCi/mM または394μCi/mg，その放射化学純度は尿素による稀釈法で105％，濾紙クロマトグラフィー法で100％のものであつて融点132°Cである．従つて一応純粋なものであると考えても差支えなく事実第2図bの濾紙クロマトグラムでは単一のスポットを示している．しかし同じ試料を薄層クロマトグラフィーにより展開するとRf 0.63付近に非常に濃厚な尿素のスポットがみられるほかにRf 0.56，0.50および0.32付近のスポットによる感光が認められた．もちろんこの感光は非常に弱いが明らかに放射能を持つ物質のスポットであることを示し不純物の夾雑を示唆している．このような不純物は^{14}C-尿素を水に溶かした後に生じたという可能性を否定することは出来ない．しかし溶液は冷蔵庫に保存し比較的短期間しか経過していないときに試験に用いたものである．いずれにしても濾紙クロマトグラフィーでは検出されない程度であつて，このようなブチルアルコール：酢酸：水系を用いた薄層クロマトグラフィーが尿素化合物の分離に有効なことはウラホルムの場合と同様である．その他の試料たとえばパラジメチルアミノベンズアルデヒド，亜硝酸ないしニトロプルシッドソーダで処理した場合においても薄層クロマトグラフィーでの分離が濾紙のものよりもすぐれており，それぞれ少なくも2コのスポットが検出された．また残存放射能が弱い場合多量の試料をスポットしなければならないが，この場合にも薄層が濾紙よりもすぐれていることは過マンガン酸カリ処理区で明らかなように濾紙では検出されなかつたが薄層クロマトグラムでは2コのスポットが認められた．尿素をヨードで酸化した場合も若干の生成物が検出された．この際薄層クロマトグラムでは尿素溶液中に夾雑物も検出されたのでRf 0.74のスポット以外は尿素からの生成物であるか夾雑物であるかは明らかでない．しかし濾紙クロマトグラムを検討すれば検出されたスポットは尿素に由来するものと推定される．

総　　括

1) 尿素化合物の薄層クロマトグラフィーについて尿素のほかビューレット，モノフェニール尿素，エチレン尿素，ノナメチル尿素，イソブチリンデンジ尿素およびウラホルムを用いてその展開溶媒を室温上昇法により検討した．4種の溶媒，ブチルアルコール：酢酸：水 (3：1：1)，フェノール：水 (3：1)，イソプロピルアルコール：ギ酸：水 (7：1：2) および水飽和アミルアルコールによる相互の分離はいずれも比較的

に良好であつた．とくにブチルアルコール：酢酸：水が最もすぐれていた．

2) 尿素1 μg 以上では明瞭な黄色スポットとして検出され濾紙クロマトグラフィーによる限界量よりも低かつた．さらに 0.1 ないし 0.5 μg でも淡いスポットが認められた．

3) 尿素脱水素酵素の反応液および尿素を種々の試薬で処理した反応液について薄層クロマトグラフィーと濾紙クロマトグラフィーの比較を行ない前者がすぐれていることを示した．

(食糧化学教室)

文　　献

1) 足立　達 (1953) 科学 **23**, 582.
2) 古谷貞治 (1964) 九大農学芸誌 **21**, 293.
3) 服部明彦 (1958) J. Biochem. **45**, 57.
4) Jezdic, V. and Rajnvajn, J. (1961) Bull. Inst. Nuclear Sci. 'Boris Kidrich' **12** (263) 127.
5) 大村浩久・籤島豊 (1961) Nature **190**, 345.
6) 大村浩久・籤島　豊 (1961) Agric. Biol. Chem. **25**, 487.
7) 大村浩久・籤島　豊・塚木　徹 (1966) Enzymologia **31**, 129.
8) Stahl, E. (1959) Pharm. Rundsch. **1**, No. 2.

Summary

Thin layer chromatography of urea compounds was investigated comparative to paper chromatography using silica gel G. The compounds were detected as yellow spots by spraying Ehrlich's reagent followed by heating at 110°C for 10 minutes.

Butyl alcohol : acetic acid : water (3 : 1 : 1), phenol : water (3 : 1), iso-propyl alcohol : formic acid : water (7 : 1 : 2) and amyl alcohol saturated with water were examined as solvent.

Using these solvents, Rf values of urea, biuret, monophenylurea, ethyleneurea, nonamethylurea, isobutylindendiurea and uraform were examined by one-dimensional ascending procedure. Good separation of these compounds was obtained. Among the solvents, it was found that butyl alcohol : acetic acid : water is the best and amyl alcohol saturated with water is the next. On the sample of uraform, 3 spots were detected by the former and 2 by the latter, although each one spot was estimated by others.

Clear yellow spot of urea was detected with butyl alcohol : acetic acid : water as solvent when 1 μg of urea had been applied. Vague one was also observed with 0.1 to 0.5 μg, contrary to 5 μg on paper chromatogram.

As practice, reaction products from ^{14}C-urea by urea dehydrogenase of perilla leaf were separated by thin layer and paper chromatographies. ^{14}C-urea was treated with some kinds of reagents such as p-dimethylaminobenzaldehyde, ninhydrin, sodium nitrite, potassium ferricyanate, sodium nitroprusside, potassium permanganate and iodine. These reaction mixtures were chromatographed on thin layer and paper too. Radioactive compounds were detected by autoradiography. In these cases, better results were obtained by thin layer chromatography.

Laboratory of Food Chemistry,
Department of Food Science and Technology,
Kyushu University.