

トリオースレダクトンとイソロイシンの縮合物

篠原, 和毅
九州大学農学部食糧化学教室

朱, 光枝
九州大学農学部食糧化学教室

曾, 耀崑
中国化学学院家政学研究所

村上, 浩紀
九州大学農学部食糧化学教室

他

<https://doi.org/10.15017/23212>

出版情報：九州大学農学部学藝雑誌. 30 (4), pp.157-161, 1976-03. 九州大学農学部
バージョン：
権利関係：

トリオースレダクトンとイソロイシンの縮合物*

篠原和毅・朱 光枝・曾 耀崑†

村上浩紀・大村浩久

九州大学農学部食糧化学教室

(1976年1月19日受理)

Condensation Product of Triose Reductone with Isoleucine

KAZUKI SHINOHARA, KWANG JEE JOO, YAW-KUN TSENG,
HIROKI MURAKAMI and HIROHISA OMURA

Food Chemistry Institute, Faculty of Agriculture,
Kyushu University, Fukuoka

代表的レダクトンであるトリオースレダクトン (TR) は種々のアミノ化合物と縮合して、アミノレダクトンを形成することが知られている。このアミノレダクトンは食品の加工、貯蔵等の過程における褐変や変色反応の重要な中間体であるが、われわれはこれらアミノレダクトンの生理的機能に着目し、その解明のためにまず、TR と種々のアミノ酸との縮合物の調製を行なってきた。その結果、徳山ら (1970)、および小幡・徳山 (1971 b) と同じく、TR とグリシン、ロイシン、メチオニン、フェニルアラニンとの縮合物を結晶状に単離し、それらの物理的および化学的諸性質を明らかにするとともに、それらの生理的機能の一つとして核酸切断作用を確かめた (大村ら, 1974 b; 篠原ら, 1974)。そのほか、バリン、アラニンとの縮合物も得られているが、他のアミノ酸とのそれは上述のアミノ酸に対して用いられた調製法では得ることはできない。篠原ら (1975) は調製法を種々検討することによって、最近 TR とトリプトファンとの縮合物を単離結晶化することに成功した。本報においては同様な方法によって、TR とイソロイシンの縮合物を得たので、その調製法ならびに生成物の性質について報告する。

実験材料および方法

トリオースレダクトン (TR) 常法 (大村ら, 1974 a) によりブドウ糖をアルカリ処理して調製した。

ペーパークロマトグラフィー 東洋濾紙 No. 51 を用い、上昇法により行なつた。検出試薬として、0.05% 2,6-ジクロロフェノールインドフェノール (DPI) 50% エタノール液と 0.2% ニンヒドリン液を使用した。

紫外吸収スペクトル 島津マルチパーパス自記分光光度計 MPS-50 型で測定した。

赤外吸収スペクトル バックマン IR-20 型で KBr 錠剤法により測定した。

Mass スペクトル 日立製 RMS-4 型を用い、直接導入方式で測定した。

NMR スペクトル 日立 Perkin Elmer R 20 型を用い、重ジメチルスルホキシド (hexadeuteriodimethylsulfoxide; DMSO-d₆) を溶媒として測定した。内部標準にはテトラメチルシラン (TMS) を使用した。また重水 (D₂O) 交換を行なつたものについても測定した。

結果および考察

1. TR-Ile¹⁾ の調製

TR-Trp¹⁾ の調製法と同様に、終濃度が 1 モルになるように Ile を 100°C の油浴上、N₂ ガス通気下で 0.2N HCl に溶解したのち、等モルになるように TR を加える。引き続き、N₂ ガスを通気しながら、また同時に攪拌して 100°C の油浴上で反応させた。反応開

* レダクトン類の機能に関する研究 第 19 報

† 現在中国文化学院家政学研究所

¹⁾ TR-Ile, TR-Trp; TR とイソロイシン、トリプトファンとの縮合物を表わす。

Table 1. Yield, melting point and elemental analysis of TR-Ile.

Yield (%)	Melting point (°C)	Elemental analysis					
		Calculated			Found		
		C	H	N	C	H	N
29.8	168	53.73	7.46	6.96	53.74	7.57	6.90

始後、約15分で結晶が析出しはじめる。さらに反応を30分継続したのち、1夜冷蔵庫に放置する。結晶を濾集し、活性炭で脱色し、エタノールから再結した。再結は3回繰り返した。Table 1に収率、融点および元素分析値を示す。

収率は29.8%で今まで得られた縮合物の場合よりも若干低かった。また融点もわずかながら低いようであった。元素分析の結果は計算値とよく一致した。

TR-Ileの単離結晶化はTR-Trpの調製と同様な方法で容易にできたが、TRと他のアミノ酸、例えば酸性アミノ酸、塩基性アミノ酸についてはこれと同じ方法を用いても縮合物は結晶状に得られなかった。しかしながら、これらのアミノ酸の場合には縮合物の生成を示す結果が得られているので、他の分離方法を用いることによつて単離結晶化も可能と考えられる。

2. ペーパークロマトグラフィー

Table 2に示したような種々の溶媒を用いてペーパークロマトグラフィーを行なった結果、いずれの溶媒においてもDPI還元性でニンヒドリンの発色に陽性の単一スポットが検出された。その R_f 値をTR, IleのものとともにTable 2に示す。展開溶媒としてはブタノール・酢酸・水およびエチルアセテート・酢酸・水が比較的良好な分離を示した。

3. 紫外吸収スペクトルおよび安定性

TR-Ileを酸性、中性およびアルカリ性の各緩衝液

に溶かし、その紫外吸収スペクトルを測定した。また同時に各溶液を室温に4時間放置したのち、再びスペクトルを測定し、その安定性を検討した(Fig. 1)。

TR-Ileは水に比較的難溶であるのでまず少量のエタノールに溶かしたのち、0.1 M HCl-KCl (pH 2.0), 0.1 M リン酸 (pH 7.0), あるいは0.1 M NaOH-KCl (pH 12.0)の各緩衝液を加え、終濃度が5 μ Mになるように調製した。

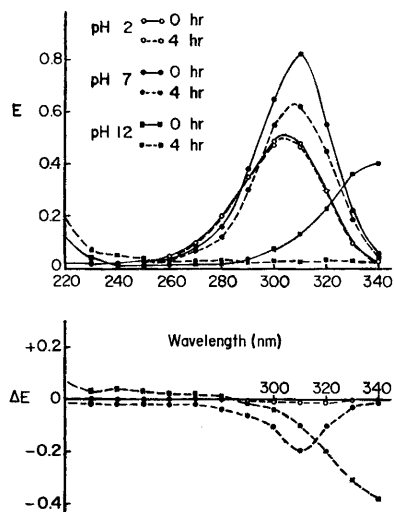


Fig. 1. UV absorption spectrum and its variation of TR-Ile. TR-Ile was first dissolved in a small volume of ethanol, and then 0.1 M HCl-KCl (pH 2.0), 0.1 M phosphate (pH 7.0) or 0.1 M NaOH-KCl (pH 12.0) buffer was added. The final concentration of TR-Ile was 5 μ M. UV absorption spectrum was estimated at once and after standing at room temperature for 4 hrs with a Shimadzu Multipurpose Recording Spectrophotometer, MPS-50.

Table 2. Paper chromatography of TR-Ile.

Solvent	R_f value		
	TR	Ile	TR-Ile
Butanol saturated with H ₂ O	0.59	0.48	0.56
Butanol : Acetic acid : H ₂ O (4 : 1 : 2)	0.68	0.61	0.85
Butanol : Pyridine : H ₂ O (4 : 1 : 2)	0.58	0.39	0.39
Ethanol : H ₂ O (9 : 1)	0.77	0.68	0.73
Methanol : H ₂ O (9 : 1)	0.76	0.76	0.80
Butyl acetate : Acetic acid : H ₂ O (4 : 2 : 1)	0.56	0.04	0.37
Ethyl acetate : Acetic acid : H ₂ O (3 : 1 : 1)	0.74	0.47	0.99
Ethyl formate : Formic acid : H ₂ O (3 : 1 : 1)	0.84	0.98	0.95

TR-Ile was detected with 0.05% sodium 2,6-dichlorophenolindophenol solution (in 50% ethanol) and 0.2% ninhydrin solution.

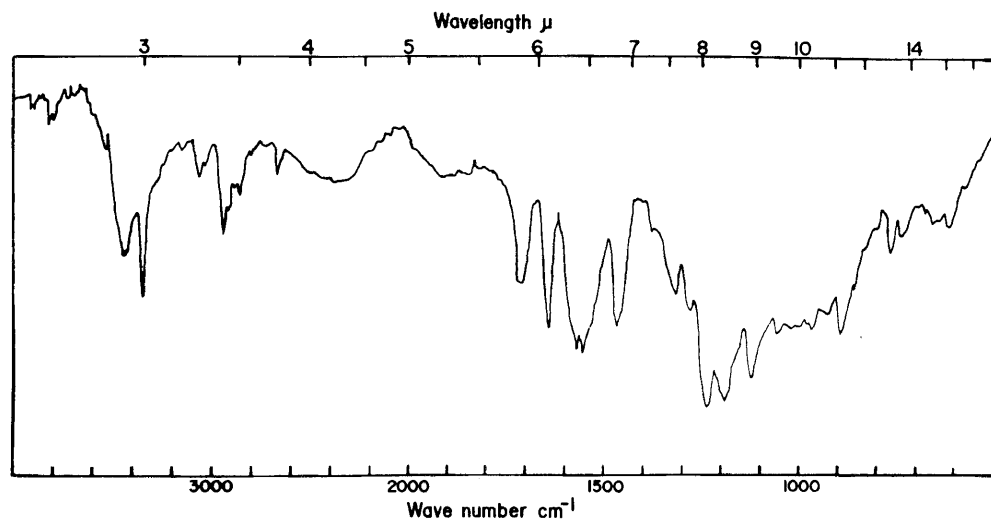


Fig. 2. IR spectrum of TR-Ile. IR spectrum of TR-Ile was estimated by KBr pellet method with a Beckman IR-20.

その結果、他の TR-AA²⁾と同様に縮合物に特徴的な吸収スペクトルが得られた。各 pH における吸収極大は pH 2.0 で 304 nm, pH 7.0 で 310 nm, pH 12.0 では 340 nm であった。このアルカリ性領域における極大の移行は TR-Gly³⁾, -Leu³⁾, -Met³⁾, -Phe³⁾ においても観察されている。

一方、TR-Ile も他の TR-AA と同様に酸性領域で最も安定で、4 時間後の吸収スペクトルではほとんど変動はみられなかった。中性領域においてはわずかな 310 nm の吸収の減少が観察されたが、比較的安定であるように思われた。酸性、および中性領域に対して、アルカリ性側では不安定であり、その吸収極大は著しく減少した。他方、Cu²⁺ 共存下では他の TR-AA において観察されたように著しい吸収極大の減少がみられたが、特に pH 7.0 および 12.0 において顕著であった。

4. 赤外吸収スペクトル

Fig. 2 に TR-Ile の赤外吸収スペクトルを示す。縮合物に特徴的な吸収帯が観察された。すなわち、3440 cm⁻¹ に NH 伸縮振動、2400 cm⁻¹ 付近にエノール性水酸基の伸縮振動、1720 cm⁻¹ 付近にカルボン酸の C=O 伸縮振動、1640 cm⁻¹ にアルデヒド基の C=O 伸縮振動が観察された。

5. Mass スペクトル

Fig. 3 に示したように、相対強度 67.7% の分子イ

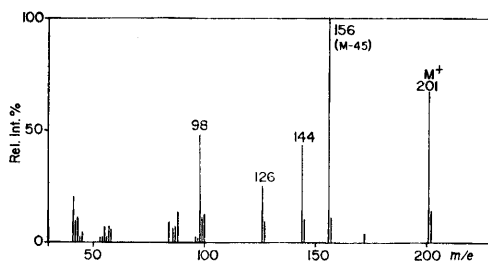


Fig. 3. Mass spectrum of TR-Ile. Mass spectrum of TR-Ile was estimated with Hitachi RMS-4.

オンピーク (m/e 201) と 30% 以上の 4 つのフラグメントイオンが観察された。m/e 201 は計算値と一致した。TR-AA の開裂について小幡・徳山 (1971 a) は 3 つのパターンが存在すると報告している。TR-Ile の場合には m/e 156 (M-45), 144, 126, 98 のフラグメントイオンが生じるために TR-Ile から COOH が脱離し、さらに Ile 部分の側鎖が脱離する経路と、側鎖が脱離したのち、H₂O, CO が脱離して m/e 98 のフラグメントイオンを与える経路の 2 つのパターンで開裂するように考えられる。

6. NMR スペクトル

TR-Ile の DMSO-d₆ を溶媒にしたときの NMR スペクトルを Fig. 4 に、また重水交換を行なったものを Fig. 5 に示す。

²⁾ TR-AA; TR とアミノ酸との縮合物を表す。

³⁾ TR-Gly, -Leu, -Met, -Phe; それぞれ TR とグリシン, ロイシン, メチオニン, フェニルアラニンとの縮合物を表す。

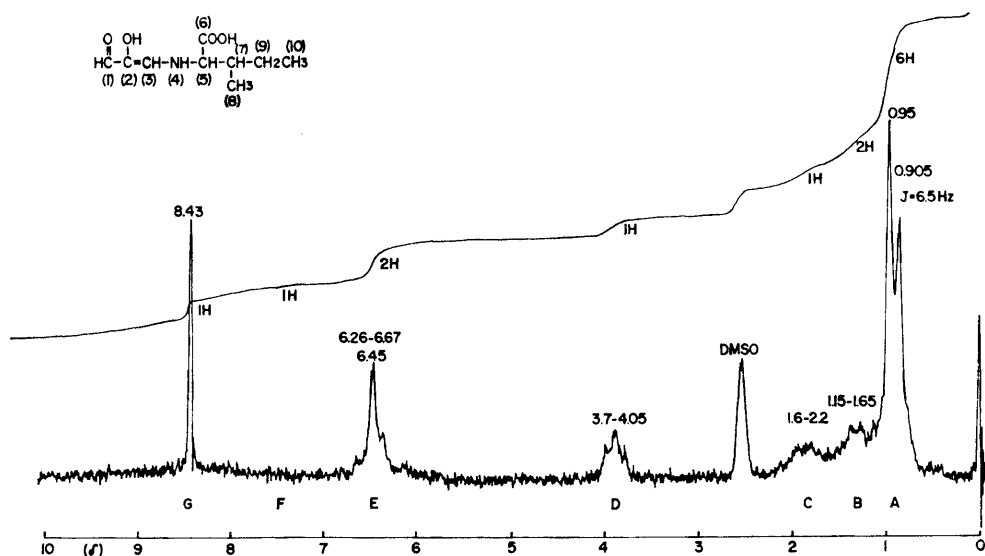


Fig. 4. NMR spectrum of TR-Ile. NMR spectrum was estimated with a Hitachi Perkin Elmer R-20, using hexadeuterodimethylsulfoxide (DMSO- d_6) as solvent and tetramethylsilane as internal standard.

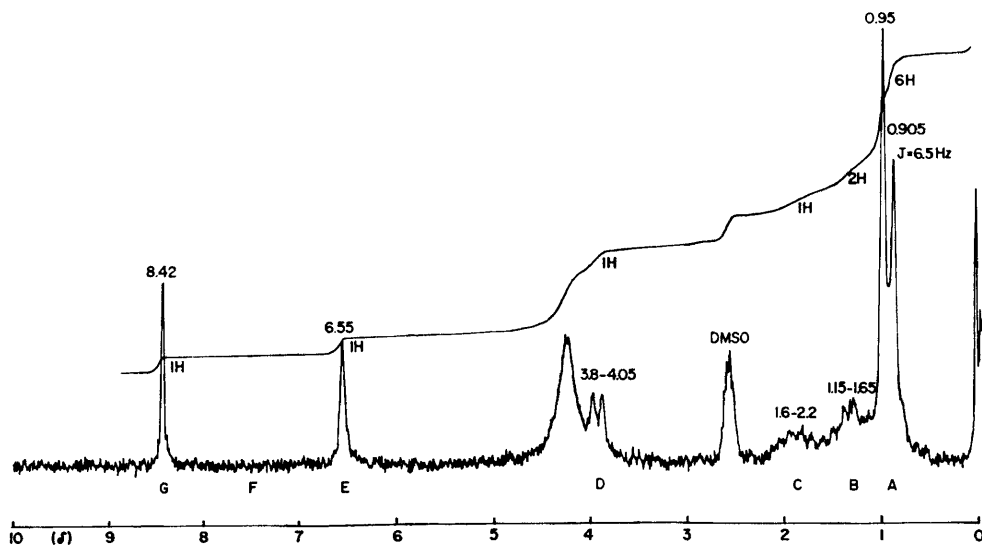


Fig. 5. NMR spectrum of TR-Ile after D_2O exchange. NMR spectrum was estimated as in the case of Fig. 4.

δ 0.95 ppm にピークをもつスピン結合定数 $J=6.5$ Hz のトリプレットと、 δ 0.905 ppm のダブルットが重なったと思われる 6 プロトンの吸収 (A), δ 1.15~1.65 ppm に 2 プロトンのマルチプレット (B), δ 1.6~2.2 ppm に 1 プロトンのマルチプレット (C), δ 3.7~4.05 ppm にブロードな 1 プロトンのマルチプレット (D), δ 6.45 ppm にピークをもつシングレ

ットと δ 6.26~6.67 ppm のブロードなピークが重なった 2 プロトンからなる吸収 (E), δ 7.0~8.2 ppm に積分曲線から 1 プロトン分の吸収 (F), δ 8.43 ppm にシャープな 1 プロトンのシングレット (G) が観察された (Fig. 4).

(A) は (8) と (10) のメチルプロトンに帰属される。(B) は (9) のメチレンプロトンに、(C)

は(7)のメチンプロトンに帰属できる。(D)は先に大村ら(1974b)が報告したTR-GlyのNMRスペクトルとの対応から(5)のメチンプロトンに帰属される。(E)は重水交換により δ 6.55 ppmに1プロトンのシャープなシングレットのピークが現われ、1プロトン消失することから、 δ 6.55 ppmのピークは(3)のプロトンに、消失するプロトンは(4)のプロトンに帰属される。(F)は重水交換によつて積分曲線が平坦になることから、(2)のOH基のプロトンに帰属できる。(G)は(1)のアルデヒドプロトンに帰属できる。(6)のカルボキシル基のプロトンはTR-Ileの場合には検出されなかつたが、これらのことから、TR-IleはFig. 4に示した構造をもつことが確認された。

要 約

Ileを終濃度が1モルになるように0.2N HClに完全に溶解したのち、等モルのTRを加え、窒素ガス通気下に100°Cの油浴上で反応させることによつて反応生成物を結晶状に単離した。

さらに生成物について、元素分析、融点、ペーパークロマトグラム、紫外吸収、赤外吸収、Massおよび

NMRスペクトルを測定し、その諸性質を検討し、TRとIleが縮合したアミノレダクトン(TR-Ile)であることを確認した。

文 献

- 小幡 齊・徳山 泰 1971 a トリオースレダクトン誘導体の質量スペクトル. 日化, 92(5): 469-472
 小幡 齊・徳山 泰 1971 b トリオースレダクトンとアミノ酸との縮合物. 日化, 92(6): 566-567
 大村浩久・藤田明男・佐藤雅子・大槻 実・飯尾雅嘉 1974 a トリオースレダクトンと数種含窒素化合物との反応. 九大農芸誌, 28(2): 79-92
 大村浩久・井上 譲・江藤正義・曾 耀崑・篠原和毅 1974 b トリオースレダクトンと二三のアミノ酸との反応生成物. 九大農芸誌, 29(1・2): 61-70
 篠原和毅・福元裕二・曾 耀崑・井上 譲・大村浩久 1974 アミノレダクトンの核酸に対する作用. 農化, 48(9): 499-506
 篠原和毅・曾 耀崑・朱 光枝・内野文弘・大村浩久 1975 トリオースレダクトンとトリプトファンとの縮合物. 農化, 49(9): 463-468
 徳山 泰・小幡 齊・大亦正次郎 1970 トリオースレダクトンとアミノ酸との縮合生成物. 日本農芸化学会昭和45年度大会講演要旨集, pp. 371-372

Summary

Ile was completely dissolved in 0.2N HCl to final concentration of 1 M and then equimolar TR was added at 100°C in an oil bath under bubbling with N₂ gas. The reaction mixture was kept for 45 min under the same conditions. The product was separated as crystals. The yield was 29.8%.

It was confirmed that the crystals were condensation product of TR and Ile by estimating elemental composition, melting point, paper chromatogram, UV, IR, Mass and NMR spectra.