

オキシムの生化学的研究(第4報) : アルドオキシムの生成速度に就て

秋田, 利彦
九州大学農学部農産製造学教室

<https://doi.org/10.15017/21313>

出版情報 : 九州大学農学部学藝雑誌. 14 (3), pp. 399-406, 1954-03. 九州大学農学部
バージョン :
権利関係 :



オキシムの生化学的研究 (第4報)

アルドオキシムの生成速度に就て

秋 田 利 彦

Biochemical studies on oximes. Part 4.

On the velocity of formation of aldoximes

Toshihiko Akita

緒 言

細菌による窒素固定の中間産物としてオキザール醋酸の出現する事が報ぜられ、(Blom, 1931; Endress, 1934; Virtanen & Laine, 1938) アミノ酸生成の一経路として、ヒドロキシルアミン→オキシム→アミノ酸なる過程が考えられ、その真偽に対して種々論議されているが、著者の研究室に於てもヒドロキシルアミン誘導体のバイラス発病効果に関連して、オキシム化合物が動植物界に相当広く分布する事(山藤, 秋田, 稲岡, 1950) 及びオキシムよりアミノ酸への還元を触媒する酵素の存在する事が明らかにされた。(山藤, 1950). 而して此の過程の前半の反応は非酵素的で而も瞬間的に行われるものとされているが、水溶液中に於ける低濃度のオキシム生成速度に関する定量的研究は 1/10 乃至 1/40 モル濃度で行われ、Barett 氏等はアセトオキシム生成速度が塩酸、苛性曹達の存在により著しく増大する事を報じているが、アセタルドキシムの場合は常に一致する値を得る事が出来なかつたと述べている。(Barett & Lapworth, 1908; Acree & Johnson, 1907, 1908). 著者は前報(秋田, 1951) ケトオキシム生成速度に引続き 1/1000 モル濃度のアルドオキシム生成速度を比較しアセタルドキシムに就ては更に微量の測定法を見出し酸及びアルカリの影響を詳細に研究した。

測定方法に就て

測定は一定時間毎に未反応のヒドロキシルアミンを定量した。

I. オキシムと混在するヒドロキシルアミン定量

(1) 10^{-3} モルの場合: 前報と同様 Rupp 氏等の方法(Rupp & Maeder, 1913)によつた。即ち醋酸曹達 0.2 g に N/100 沃度を過剰に加えた容器中に反応液 10 cc を投入して過剰沃度を N/200 テオ硫酸曹達にて滴定した。而して硫酸及び苛性曹達共存下にオキシム生成速度を測定する際はヒドロキシルアミンの定量が中性で行われねばならないので醋酸曹達混液に中和するに足る苛性曹達又は硫酸を予め添加して置く必要がある。然るに沃度にアルカリを添加して置く時は当量の酸の添加によつては一旦生成された次亜沃素

酸曹達が全ては遊離の沃度とならない事及び次亜沃素酸曹達がアルデヒドと反応する許りでなくオキシムをも酸化する事が判り、此のため一定値を得られないが、酸混在下の測定の際は醋酸曹達量を 2 g 迄増加する事によつて上記の妨害を排除し得た。

(2) 4×10^{-5} モルの場合：滴定法が適用されないので Rupp 氏の方法と Blom 氏の比色定量法 (Blom, 1926; Endress, 1935; 近藤及び秋田, 1950) とを組合せた比色定量法を案出して之によつた。Blom 氏法はヒドロキシルアミンがスルファニール酸の共存下に醋酸酸性で沃度により定量的に亜硝酸に酸化され、チアゾベンゾールスルホン酸を生じ、之に α -ナフチルアミンを添加発色せしめるのであるが、醋酸酸性では混在するオキシムの加水分解を来す為遊離ヒドロキシルアミンのみの定量が出来ない。従つて中性に於ける滴定法の際中和したスルファニール酸を添加して置いて酸化せしめた処同様定量的に亜硝酸に酸化せられる事が判つた。実際の定量は次の如く行つた。

1.5 モル醋酸曹達 1 cc に中和スルファニール酸 1% 液 1 cc, N/10 沃度、沃度加里溶液 0.3 cc を混じ之に被検液 5 cc を加え、混合後過剰沃度を N/10 チオ硫酸曹達にて除去し、N/2 塩酸 3 cc 及び醋酸 30% 液 1 cc を加えた後 α -ナフチルアミン (4 g を 1 l の沸騰蒸留水に溶解直ちに濾過冷却後濃塩酸 1 cc 添加) 1 cc を添加発色せしめ、標準亜硝酸のスルファニール酸、醋酸、 α -ナフチルアミンによる呈色と比較測定した。色調の測定は 15~20 分後に行つた。酸化の時間は第 1 表の如く長くなる程低下するので、1 分以内にチオ硫酸曹達を加える事とした。表中の数字は理論値を 100 とし、数%の誤差範囲があるので数回の実験の平均値を示した。而して本定量法に於ては必然的に NO_2 , N_2O , NO 等の窒素酸化物も定量値中に入つて来る。

第 1 表. 醋酸曹達及びスルファニール酸共存下に於ける
 NH_2OH (2×10^{-5} N) の酸化。

酸 化 時 間	分	0.5	1.0	2.0	5.0	10.0
呈 色 率	%	93	93	92	88	79

次に強アルカリ性乃至強酸性では遊離ヒドロキシルアミンは不安定であり、ヒドロキシルアミンの消失が全てオキシムに変化した為であるか疑問であるから、オキシムの定量がなされねばならない。然るに従来のオキシム微量定量法としてはオキシムを酸に依つて加水分解して遊離するヒドロキシルアミンを Blom 氏法により定量する Endress 氏の方法があるが、本方法は加水分解の条件が各オキシムにより異なり、且つ完全に分解する事も出来ないのと、ヒドロキシルアミン定量も亦完全に行ふ事が困難である。加水分解の困難なる焦性葡萄糖オキシムの如きは当量の亜硝酸に比し 50~60% が呈色するに過ぎない上、常に一致した値を得る事が困難なので、酸加水分解に依らずにオキシムを相当正確に定量する方法を考究した。

II. オキシム微量定量法

オキシムがアルカリ共存で沃度を消費する事は前述した処である。従つて N/100 沃度 5 cc にアセタルドキシム M/100 1 cc 及び N/10 苛性曹達 10 cc を加え、30 分放置後醋酸酸性とし、残りの沃度をチオ硫酸曹達で除去してグリース試薬で検した処、当量の亜

硝酸に比し 61% 呈色した。オキシムの次亜硝酸酸曹達による酸化分解の研究は見当らなかったが、アセタルドキシムは中和した過硫酸によりアセトヒドロキサム酸とニトロエタンを生じ、後者は酸により HNO_2 , N_2O に分解される。又焦性葡萄糖オキシムは NaOH と KMnO_4 により N_2O_4 及びエチルニトロール酸を生ずる。(Bamberger & Schentz, 1901; Bamberger & Seligman, 1902) 而もヒドロキシルアミンは沃度により酸化されて N_2O になるがスルファニール酸共存下では定量的に HNO_2 に酸化される。以上の事から Blom 氏がスルファニール酸共存下に醋酸酸性でヒドロキシルアミンを沃度により亜硝酸に酸化し α -ナフチルアミンを加えてアゾ色素として比色定量した手法にならつて、スルファニール酸共存で沃度及び苛性曹達によりオキシムを酸化し完全に亜硝酸に酸化される条件を求めた。以下の数値は従来の方法で最も定量の困難な焦性葡萄糖オキシムについて行つた結果である。試薬の調製も Blom 氏法と同様にしたが、スルファニール酸の醋酸溶液は之を分けて中和スルファニール酸及び 30% 醋酸と別にし、又沃素も沃度加里 2% に溶解した。苛性曹達量は出来るだけ少量にするため 5N を用いたが、後 N/2 とした。即ち

- 1) スルファニール酸曹達 1% 液 1 cc. 2) 沃度 N/10 0.3 cc. 3) 苛性曹達 N/2. 4) 醋酸 30% 液. 5) N/10 チオ硫酸曹達. 6) α -ナフチルアミン溶液 1 cc.

先ず醋酸量を決定するために上記の順に被検液に試薬を加え 5N 苛性曹達 1 滴を加え、30 分放置後醋酸を添加した後 5) により過剰沃度を除去し、6) を加えて発色せしめた後 15~20 分後測定した。その結果は第 2 表の如く 0.2 cc 以上大差なく従つて Blom 氏法同様 1 cc を用いる事とした。苛性曹達の必要量を見るために N/2 液を用いて試験したが、0.2~0.4 cc で 90% 呈色するがそれ以上では低下する。之は酸度の不足による呈色の不完全から来るものと考えられ醋酸添加後に添加苛性曹達及びスルファニール酸曹達当量の塩酸を加えた処第 4 表の如く 0.1~0.3 cc で完全に呈色した。而して 0.1 cc で沃度の赤褐色は黄色に変ずる故被検液中に酸の含まれる時は此の変色点迄苛性曹達を入れる必要がある。以後の実験は苛性曹達 0.15 cc 塩酸 N/2 0.25 cc を使用して行つた。此の時の

第 2 表. 醋酸量による呈色の変化 (2×10^{-5} N オキシム).

30% 醋酸 cc.	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.75	1.0	2.0
呈 色 率 %	85	92	90	91	91	91	91	91

第 3 表. 苛性曹達による呈色の変化 (2×10^{-5} N オキシム).

N/2 NaOH cc.	0.05	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6
呈 色 率	74	100	100	100	98	97	96

第 4 表. 色 調 の 安 定 性 15°C.

オキシム濃度 $\times 10^{-5}$ N	2.0					6.0				
発色後の時間 分	10	15	20	40	60	10	15	20	25	40
呈 色 率 %	98	100	100	99	99	92	100	99	97	93

α -ナフチルアミン添加前の pH は約 3 であった。

次に α -ナフチルアミン添加後の着色度及び色調の安定性は第 4 表の如く $2 \times 10^{-5}N$ では 10~20 分で、 $6 \times 10^{-6}N$ では 15 分後に測定を要するが前者の場合は長時間比較的安定である。

酸化時間を第 5 表に示したが 15° では 30 分、25° では 20 分を要し、加熱すれば短縮せられるが呈色率はやや低下する。此の低下は亜硝酸に就て同様操作した場合の第 6 表より明かな如く、生成した亜硝酸の不安定に基くものと考えられ、他のオキシムでは酸化条件が異つて来るものと考えられるので以後の実験では室温にて 30 分酸化する事とした。

第 5 表. 温度による呈色の変化 (2×10^{-5} オキシム).

温 度 °C	100	90	80	70	15					25
酸 化 時 間 分	1	1	1	5	5	15	20	30	60	20
呈 色 率 %	97	97	97	98	44	66	96	100	100	100

第 6 表. 亜硝酸の沃度酸化 ($2 \times 10^{-5} NO_2$).

温 度 °C	100			70	25
酸 化 時 間 分	0.5	1	2	5	30
呈 色 率 %	91	83	82	100	100

之を要するに、被検液 10 cc にスルファニール酸 1 cc, 沃度 0.3 cc 添加し苛性曹達 0.15 cc を加えて混合 30 分後醋酸 1 cc 苛性曹達と当量の N/2 塩酸を加えて過剰沃度をチオ硫酸曹達やや過量にて除去し、之に α -ナフチルアミンを 1 cc 添加して発色せしめ 15~20 分後に、同操作に依る標準亜硝酸の呈色液と比色測定する。

本定量法の適応性に就てはヒドロキシルアミン及びアセタルデヒド, n-ブチルアルデヒド, 焦性葡萄糖酸, オキサール醋酸の各オキシムに対しては同条件で適用出来る事を確めたが、アセトオキシムには適用出来ず、アルドオキシム及び α -ケト酸のオキシム類に適用されるものと考えられる。

実 験

I. アルドオキシム生成速度の比較

使用したアルデヒドはアセタルデヒド, ホルムアルデヒド, ベンザルデヒド, n-ブチルアルデヒドの 4 種である。何れもヒドロキシルアミン、アルデヒド共に 1/1000 モルになるよう混合し、中性に於けるヒドロキシルアミンの不安定性の故に以下の実験も共に 0° で反応せしめた。先ず 4 種のアルデヒドに就きヒドロキシルアミン硫酸塩の場合と之を中和した場合との比較を行つた。

オキシム生成の速度は単一でなく而も反応が急で速度恒数が求められなかつたので、Barett 氏等の例にならい最終オキシム濃度の 50% に達する迄の時間をグラフによつて求め、此の逆数の 100 倍を以て比較速度指数として比較した。其の測定値の一部を第 7 表

第7表. アルドキシム生成速度に及ぼす H_2SO_4 の影響.

オキシム	H ₂ SO ₄ 濃度 10 ⁻³ M	NH ₂ OH 減少 %					比較速度
		時間					
		1 分	5 分	10 分	20 分	24 時	
アセタルドキシム	0	6.6	24.7	42.4	63.1	100	7.8
	1	42.1	69.8	78.6	83.9	90.0	79.4
ホルムアルドキシム	0	—	5.2	13.2	35.4	100	3.7
	1	—	11.5	19.5	30.4	87.0	2.3
ベンザルドキシム	0	—	4.8	7.5	14.1	100	0.9
	1	—	7.4	13.5	24.2	85.8	2.0
N-ブチルアルドキシム	0	18.7	39.8	50.0	61.9	100	10.1
	1	45.4	72.4	81.2	87.2	90.7	100.0

に示した.

此の結果より見れば各オキシムに就て硫酸の影響は異り、アセタルドキシム、n-ブチルアルドキシムでは約 10 倍に加速されるがホルムアルドキシムでは却て低下する。かくして微量なる酸の存在が相当大きく影響する上に此の酸に依る影響は各オキシムで最適なる濃度が異なるものと推定されるので、そのオキシム生成速度は一概に比較出来ない。従つて上記 4 種のオキシム中、最も硫酸により加速されるアセタルドキシムに就て硫酸及び苛性曹達の影響を見た。

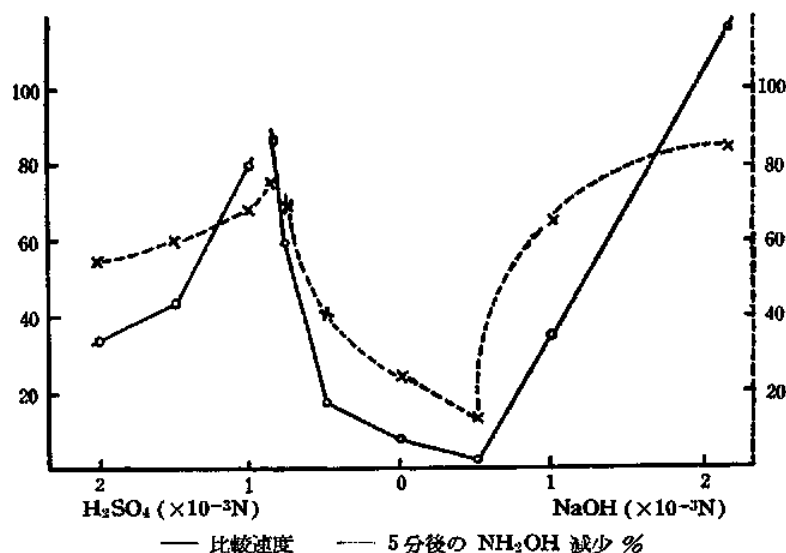
II. アセタルドキシム生成速度に及ぼす硫酸及び苛性曹達の影響

前実験同様 10^{-3} モルで行つた。反応の速やかな場合は 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10, 15 分

第8表. アセタルドキシム生成速度に及ぼす H_2SO_4 及び NaOH の影響.

	濃 度 10 ⁻³ N	NH ₂ OH 減 少 %					比較速度
		時 間					
		1 分	5 分	10 分	15 分	24 時	
H ₂ SO ₄	100	—	2.6	4.5	6.1	38.9	1.1
	10	4.7	17.1	27.6	35.6	75.2	6.3
	5	9.5	30.0	44.0	52.5	83.4	12.4
	2	22.2	54.1	67.2	73.9	87.3	33.7
	1.5	30.2	60.4	74.0	—	88.5	47.7
	1	42.1	69.8	78.6	82.5	90.0	79.4
	0.85	42.3	76.5	84.9	87.8	91.2	86.9
	0.75	36.7	71.6	81.5	85.5	91.0	60.6
	0.5	28.5	39.7	64.4	82.3	91.9	15.9
	0	6.6	24.0	42.4	55.0	100	7.8
NaOH	0.5	4.8	12.9	—	29.8	100	2.4
	1.0	24.9	64.1	79.6	87.1	100	33.9
	2.0	52.8	85.3	91.4	93.7	100	111.0

毎に、遅い場合は 5, 10, 20, 30, 60 分で測定したが、その結果は第 8 表の如くであつた。此の結果を第 1 図に示したが、硫酸の共存では凡そ 0.85×10^{-3} N H_2SO_4 の場合に最高速度を示し、苛性曹達の共存では 0.5 N 共存では最低でそれ以上では比較速度曲線は



第 1 図. アセタルドキシム生成速度に及ぼす H_2SO_4 及 NaOH の影響.

直線の上昇を示す。之等の傾向は最初の 5 分間に於けるオキシム生成曲線と一致するので以後は之によつて比較する事にした。尙本実験以後オキシム定量法を確定したのでヒドロキシルアミン消失度をそのままオキシム生成度と見做した。

III. アセタルドキシム生成速度と pH

先ず 10^{-3} モルに就て行つたが緩衝液は何れも N/50 になるように加えた。緩衝液の種類による差は殆ど見られなかつた。又測定は滴定法に依つたが最後にヒドロキシルアミンが全てオキシムに転換したものの可否かをも検した。比色定量による之等分析の結果を第 10 表に示した。

第 9 表. アセタルドキシム生成速度 (10^{-3} M/l) NH_2OH 減少 %.

緩 衝 液	pH	Acetate				Phosphate			Atkins-Pantins			
		2.7	3.2	4.1	5.3	6.2	7.0	8.0	8.6	9.2	10.0	11.0
1 分		28.1	48.4	39.3	33.3	20.1	6.9	—	—	—	—	22.9
5 分		57.1	84.2	70.6	50.2	43.3	30.7	19.4	16.0	12.7	17.8	53.9
10 分		70.2	89.1	84.0	62.7	57.6	50.8	33.8	28.2	18.5	26.6	70.4
24 時		90.9	94.8	95.4	96.6	97.1	99.0	100	100	100	100	100

第 9 表の結果からすれば見掛け上アルカリ側で 100% オキシムが生成されるが第 10 表の示す通り実際にはヒドロキシルアミンの分解によつてオキシムとならない部分もあるが、概略的に第 9 表で其の傾向を見るに差支えない。而して第 10 表からアルカリ性の強まる

第10表 24時間後に於ける組成。

pH	2.7	3.2	8.0	8.6	9.2	10	11
NH ₂ OH, NO, N ₂ O, NO ₂ , etc.,	8.6	3.6	2.4	4.1	8.8	2.4	1.9
NO ₂	0	0	0.1	0.5	0.7	1.6	1.8
オ キ シ ム	97	96	97	96	90	92	97

につれて亜硝酸の生成が大となるので、亜硝酸とアセタルデヒドのメチル基との間に脱水結合が起つたのではないかと疑問も生ずるので、近藤氏等の方法により検したが此の種結合は生じない事が判つた。

此の結果は強酸・強アルカリの場合と全く同様の傾向を示し、強酸・強塩基の場合最高最低速度はそれぞれ $0.85 \times 10^{-5} \text{N} [\text{H}^+]$ ($=\text{pH } 3.07$), $0.5 \times 10^{-5} \text{N} [\text{OH}^-]$ ($=\text{pH } 10.7$) で、之に比し前者はほぼ一致し後者は多少ずれているが之は強酸・強塩基存在でオキシム生成の進行に連れてヒドロキシルアミンが両性電解質としての性質を失うためと考えられ、何れの場合も全く水素イオン及び水酸イオンの影響による促進と見做される。

次に 4×10^{-5} モルのオキシム生成速度を測定した。アセタルデヒド、ヒドロキシルアミン共、同濃度で混じて行い、アルカリ側ではヒドロキシルアミン分解が著しく確実に測定

第11表 アセタルドキシム生成速度 ($4 \times 10^{-5} \text{M/l}$) オキシム生成 %.

時 間	pH	3.2	4.1	4.4	4.7	5.0	5.9
5 分		20	29	41	37	36	27
10 分		28	46	52	53	50	41
30 分		53	74	81	80	80	70
24 時		78	93	96	98	99	100
分解 NH ₂ OH %/30分		4	0	0	0	0	0

出来なかつた。酸性側では第11表の結果が得られた。

表より明かな如く pH 4.4 附近に最大速度が見られ、之は $0.85 \times 4 \times 10^{-5} \text{N} [\text{H}^+]$ ($=\text{pH } 4.47$) とほぼ一致する。従つて少くとも酸性側に於てはアセタルドキシム生成速度は $[\text{NH}_2\text{OH}]:[\text{H}^+] = 1:0.85$ の時に最大速度を示し、従つてヒドロキシルアミン濃度が更に低下すれば更に中性附近に於て最大となるものと考えられる。この故にオキシム生成速度恒数が求められなかつた理由の一つは、反応の進行に連れてヒドロキシルアミン濃度と水素イオン濃度の相対比に変化がある為と考えられる。

総 括

1. アセタルドキシム、ホルムアルドキシム、ベンザルドキシム、n-ブチルアルドキシムの生成速度を M/1000 濃度に於て測定し、N/1000 硫酸の共存の影響を比較し、各オキシムにより其の影響は異なる事を見た。

2. アセタルドキシムに就て同濃度で硫酸及び苛性曹達の影響を見たが、0.85 N/1000 硫酸共存で最高速度を示し、アルカリ 0.5 N/1000 で最低を示しアルカリ量の増加と比例

的に急上昇を見た。緩衝液を用いた場合には pH 3.2 附近で最高、pH 9.2 で最低で、 4×10^{-5} モル濃度の場合 pH 4.4 で最高で、少くとも酸性側では水素イオン濃度のヒドロキシルアミンとの比が 0.85 附近に於て最高速度を示す。

3. 次亜硫酸とスルファニール酸による酸化に基くオキシムの比色定量法、及び醋酸曹達とスルファニール酸共存下に亜硝酸にまで沃度で酸化する事に基くヒドロキシルアミンの比色定量法を述べた。

文 献

- Acree, S. F. & Johnson, J. M. (1907) : Amer. Chem. J., **38**, 258.
 Acree, S. F. & Johnson, J. M. (1908) : Amer. Chem. J., **39**, 300.
 秋田利彦 (1951) : 九大農. 学芸雑誌, **13**, 164.
 Bamberger, E. & Scheutz, T. (1901) : Ber., **34**, 2029.
 Bamberger, E. & Seligman, R. (1902) : Ber., **35**, 3884.
 Barrett, E. & Lampworth, A. (1908) : J. Chem. Soc., **93**, 85.
 Blom, J. (1926) : Ber., **59**, 121.
 Blom, J. (1931) : Z. Bakt., **2**, **84**, 60.
 Endress, G. (1934) : Naturwiss., **22**, 662.
 Endress, G. (1935) : Ann., **518**, 107.
 Gutknecht, H. (1880) : Ber., **13**, 1119.
 近藤 弘, 秋田利彦 (1950) : 農化, **23**, 373.
 Virtanen, A. I. & Laine, B. (1938) : Nature, **142**, 165.
 山藤一雄 (1950) : Nature, **167**, 770.
 山藤一雄, 秋田利彦, 稲岡康 (1950) : Enzymologia, **14**, 165.

S u m m a r y

1. A colourimetric determination of oxime based on the oxidation with sodiumhypiodite in presence of sulfanilic acid to nitrite, and that of hydroxylamine in oxime solution based on the oxidation with iodine in presence of sodiumacetate and sulfanilic acid to nitrite are described.

2. The effects of sulfuric acid on the oxime formation velocity of acetaldehyde, formaldehyde, benzaldehyde, and n-butylaldehyde were compared. The accelerative effect is specific to each oxime.

3. The effects of H_2SO_4 and NaOH on 10^{-5} M acetaldoxime formation velocity were studied in detail. In presence of 0.85 N H_2SO_4 the maximum velocity, and of 0.5 N NaOH the minimum velocity were seen. And in proportion to the increase of NaOH greater acceleration was seen. In buffer solution on acidic side the maximum point was at pH 3.2, and on basic side the minimum point was at pH 9.2. In the case of 4×10^{-5} M oxime the maximum point was at pH 4.4. From these results the maximum velocity is thought to be at the point of $[NH_2OH]/[H^+] = 1/0.85$.