

# Peptideに於けるPyrrolidono基及び Acid amide基の定量に関する研究

今井 甲子男\*・大平 敏彦\*

Kashio IMAI and Toshihiko OHIRA: Studies on the Quantitative Determination of  
Pyrrolidonoyl and Acid amide groups of Peptide.

(1954年9月5日受理)

## 緒 言

著者の一人大平は1939年に *Eisenia bicyclis* より pyrrolidonoyl-glutaminy-alanine (Eisenin と命名) を分離し、又 J. S. Furton 氏等は 1949年に *Pelvetia fastigiata* より Pyrrolidonoyl-glutaminy-glutamine を分離された。

これら pyrrolidonoyl-glutamine peptide は稀アルカリ水溶液中にて処理する場合は加水分解により pyrrolidone ring は開裂し、一方 amide group はアンモニアを遊離し、而もそのアルカリ濃度を適当に止める時は peptide 結合の破壊を見ないことは著者の場合も Furton 氏等の場合も同様であり、この事実が又それ等の peptide の構造決定の一つの鍵となつていのである。

この分解を行うに際し、著者は 3% バリタ水を用い 100°C に熱してその目的を達したが、Furton の場合は Conway vessel を用い、N-NaOH 水溶液を用いて室温にて目的を達したと言う。然し著者は種々の試料につき Furton 法を適用した処、分解の状況が amide group の定量的分解は可能であつたが pyrrolidone の分解がその半量にしか達しないことを認め、ここに若干の疑念を抱き、これが解明は peptide 又は protein の研究の一端にも役立つと考え更めてこれが吟味を行い、その結果著者等の方法が平易にして一般的であることを認めるに至つたのでここに報告する。

## 実 験 之 部

### 1 実験方法

次項に挙げる試料を大平法及び Furton 法により処理し、アマイド態及びアミノ態窒素を定量し、その数値より pyrrolidone ring 及び酸アマイドの分解状況を観察した。

(a) 3% Ba(OH)<sub>2</sub>による方法(大平法) 1940年に著者の一人が pyrrolidonoyl-glutaminy-alanine に実施

したもので、次の如くである。減圧 100°C にて乾燥恒量とした試料 0.15g を 3% Ba(OH)<sub>2</sub> 水溶液(殆ど冷飽和溶液に相当) 10cc に溶解し、約 40% KOH 水溶液及び 25% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> にて順次洗滌した空気を通じつつ煮沸水浴上にて加熱し、分解により生ずるアンモニアを容器に接続した逆流冷却器の頂端に附けた導管にて一定量の 0.1N-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 水溶液に導き吸収せしめる。0.1N-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 液の容器はアスピレーターに連結して実験中常に吸引し、分解液より発生するアンモニアガスを悉く吸収させるようにする。これによる全アンモニアの発生は 3 時間を要すれば充分であるが、更に任意時間(30分程度)吸収を継続した。かくして 0.1N-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> に吸収されたアンモニアを滴定定量した。次いで残液は H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 水溶液にて中和しバリタを除去し 50cc とし Van Slyke 法にてアミノ態窒素を定量した。

(b) N-NaOH による方法(Furton 氏法) 1949年に Furton 氏等が彼等の pyrrolidonoyl-glutaminy-glutamine で行つた方法である。元來彼等は Conway vessel を使用しているが、便宜上これは用いず、条件だけを踏襲した。即ち次の如し。

減圧 100°C にて恒量とした試料 0.15g を水 10cc に溶解しこれに 2N-NaOH 水溶液 10cc を加えて 28°C の恒温槽中に置き、この間常に発生するアンモニアを導管にて 0.1N-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 水溶液中に導き、0.1N-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 入容器はアスピレーターに連結して新鮮な空気を分解瓶に導き、発生するアンモニアを悉く 0.1N-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 中に吸収せしめるようにした。操作すること 24 時間の後 0.1N-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 中に吸収されたアンモニアを滴定により定量する。分解液は 2N-HCl にて中和し 50cc としこの 2cc を採つて Van Slyke にてアミノ態窒素を定量した。

### 2 試 料

本実験に使用した試料は pyrrolidone ring と acid amide group を有するもの 2~3 の外、比較実験試料と

\* 信州大学繊維学部繊維化学教室高分子化学研究室

して diketopiperazine 2種及び glycyl-glycine を用いた。各試料は次の如くである。

a) 1-Pyrrolidonecarboxylic acid <sup>(4)</sup> 大平法により製する。即ち glutamic acid を 150°C以下にて熔融した後更に 150~160°Cに 2時間加熱を繰り返す、放冷後脱色分別結晶により得る。m. p. 140~158°C.

b) 1-Pyrrolidonoyl-amide <sup>(5)</sup> 大平法により製する。即ち diethyl glutamate を 28%アンモニア水に溶解し、数日間放置後湯浴上にて蒸発し少量となし、放冷沈澱するものを酒精より再結晶した。m. p. 163~166°C (102~105°C仮融)

c) 1-Pyrrolidonoyl-1-glutaminy-amide <sup>(4)</sup> 大平法による。即ち 1-pyrrolidonecarboxylic acid を thionyl chloride にて同酸クロリドとなし、これに diethyl glutamate を作用して生成する 1-pyrrolidonoyl-glutaminy-diethyl ester に濃アンモニア水を作用して製した。m. p. 240~241°C.

d) Glycyl-glycine <sup>(6)</sup> E. Fischer の法による。即ち 2,5-diketopiperazine を塩酸に溶解してglycyl-glycine-

HCl 塩を造り、AgOにて HCl を放し、濾液に H<sub>2</sub>S を通じ遊離 glycyl-glycine を得た。decomp. p. 215~220°C.

e) 2,5-Diketopiperazine E. Fischer の方法<sup>(4)</sup>による。即ち glycine ethylester に水を加えて放置して製する。decomp. p. 280°C.

f) 2,5-Diketopiperazine-3,6-diacetyl-diamide <sup>(5)</sup> 大平法により合成する。即ち大豆もやしより製した asparagine を diethyl aspartate となし。これより 100°C減圧にて 2,5-diketopiperazine-3,6-diacetyl-diethylester を得、更に濃アンモニア水にて処理してアマイド化した。decomp. p. 290°C.

### 3 実験結果

a) Pyrrolidone 環の開環状況 前記の如く試料を 3% Ba(OH)<sub>2</sub> 水溶液に溶解し約 100°Cにて処理する大平法及び N-NaOH 水溶液にて 28°Cにて処理する Furtton法を、2に記載した各試料につき実施し、pyrrolidone 環及び diketopiperazine 環に対する状況を比較した。この結果は Table I に示した。

Table I Amino nitrogen produced by hydrolysis of pyrrolidone and diketopiperazine rings with alkali solutions.

Sample	Theoretical value (%)	Experimental value (%)			
		with 3% Ba(OH) <sub>2</sub> at 100°C, for 3 hrs		with N-NaOH at 28°C, for 24 hrs	
		NH <sub>2</sub> -N	Decomp. ratio	NH <sub>2</sub> -N	Decomp. ratio
1-Pyrrolidone-carboxylic acid	10.85	—	—	5.10	46.65
1-Pyrrolidonoyl-amide	10.93	10.07	92.13	5.16	47.20
1-Pyrrolidonoyl-1-glutaminy-amide	5.43	5.45	99.60	3.66	66.89
2,5-Diketopiperazine	24.55*	23.83	97.08	21.86	89.40
2,5-Diketopiperazine-3,6-diacetyl-diamide	12.28*	8.31	67.68	—	—
Glycyl-glycine	21.21**	20.83	98.22	—	—

\* As the two amide linkages of diketopiperazine were decomposed.

\*\* As the peptide linkage was decomposed.

これを見るに pyrrolidone 環は 3% Ba(OH)<sub>2</sub> にて 100°C 3時間の分解にて充分加水分解されるが、N-NaOH 28°C には 24時間の処理によるも略々その半量の

分解を見るに止まり、pyrrolidonoyl 基の定量には不備であることが認められた。尚ほ附随して行つた diketopiperazine に対する作用に於ては、その分解程度が大部分

に達するも前者の如く明確な結果は得られなかつた。又 3% Ba(OH)<sub>2</sub> 使用の分解に於ては (Furton氏も N-NaOH 使用の実験で同様の結果を得たと云つているが) 著者の pyrrolidonoyl-glutaminyl-alanine (Eisenin) の実験にて主鎖の分裂が起きなかつたが、l-pyrrolidonoyl-glutaminyl-amide に於いても同様に分解後に glutamyl-glutamic acid が残るものと推定された。glycyl-glycine は同様の操作により完全に加水分解されるを見た。

このように N-NaOH を用いる場合は、pyrrolidone 環の分解率は内外に止まるので、pyrrolidonoyl-amide を試料として NaOH 溶液の濃度を N 及 2N につき分解速度を比較した。即ち試料は夫々 0.2g としこれに N 及び 2N-NaOH 30cc を加え、逆流冷却器を附して 28°C 恒温槽中に置き 1 時間毎にその 2cc 宛々を採り、Van Slyke 法によりアミノ態窒素を定量した。その結果は Table II の如くである。

Table II Effects of concentration of NaOH solution and time of reaction upon the hydrolysis of pyrrolidonoyl-amide.

In the case of hydrolysis with N-NaOH at 28°C

Time of reaction(hr)	16	20	24	40	48	64
NH <sub>2</sub> -N found(%)	5.15	5.79	6.82	8.24	8.75	9.15
Decomposition ratio(%)	47.14	52.99	62.37	75.34	80.31	83.72

In the case of hydrolysis with 2N-NaOH at 28°C

Time of reaction(hr)	4	20	24	28	44
NH <sub>2</sub> -N found(%)	4.21	8.76	9.13	10.09	10.62
Decomposition ratio (%)	38.48	80.13	83.53	92.29	97.13

本実験の結果よりこの加水分解に NaOH を用いる場合は、濃度を増して 2N-NaOH を使用しても、pyrrolidone 環を完全に開環するには、相当の長時間を要するものであることが認められた。尚ほこれ等の操作にて未開環の部は分解後の残液を煮沸湯浴上に更に加熱することにより全部分解することを認めた。

b) Acid amide の分解状況 先きに示した各試料は 1 の項に記述した実験法により処理する時は大平法、Furton 法共に試料の acid amide の定量が可能である。これは大平の Eisenin,<sup>(3)</sup> Furton 氏等の peptide に於ても示されているが、念のため l-pyrrolidonoyl-glutaminyl-amide につきこの方法を試みるに、次の Table

III に示す如く何れも適用可能であることを認めた。

Table III Comparison between the analytical results of acid amide-N of l-pyrrolidonoyl-l-glutaminyl-amide.

Reagent for analysis	Condition		NH <sub>3</sub> -N found(%)
	t°C	time(hr)	
3% Ba(OH) <sub>2</sub>	100	3	10.63
N-NaOH	28	24	10.37

Calcd. for C<sub>3</sub>H<sub>12</sub>O<sub>3</sub>N<sub>2</sub>(CONH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>: 10.93%

Ba(OH)<sub>2</sub> に就ては著者の一人が既に 3 時間が適当な分解時間であることを認めたが、N-NaOH についてこの点を試験して見た。即ち前記と同様の方法にて N-NaOH による分解を行い、その間適当な時間をおいてアンモニア吸収フラスコを交換しアンモニアの定量を行った。試料は pyrrolidonoyl-amide である。これによると Table IV の如く分解時間は浴温 20°C に於ても 9~10 時間にて充分と認めた。

Table IV Time for complete hydrolysis of acid amide of pyrrolidonoyl-amide, at 20°C. with N-NaOH solution.

Time(hr)	NH <sub>3</sub> -N(%)		Liberation ratio of ammonia (%)
	Found	Total	
0→1	2.82	—	25.80
1→3	5.61	8.43	77.13
3→5	1.45	9.88	90.39
5→7	0.60	10.48	95.88
7→9	0.40	10.88	99.54

Calcd. for C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>ON·CONH<sub>2</sub>: 10.93%

次に尚ほ l-pyrrolidonoyl-amide を試料としてアンモニウム塩定量の常法による Ca(OH)<sub>2</sub> 法及び MgO 法の二方法を実施し、amide 基に対する作用を検した。その結果は Table V の如くである。

Table V Effect of analytical methods for ammonium salt upon the acid amide of pyrrolidonoyl amide.

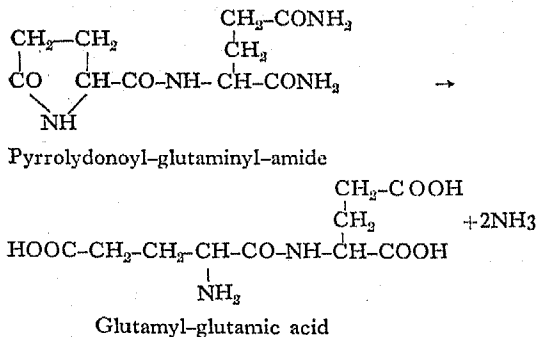
Reagent	NH <sub>3</sub> -N found (%)	Liberation ratio of NH <sub>3</sub> (%)
Ca(OH) <sub>2</sub>	2.21	20.22
MgO	0~0.20	0~1.81

Calcd. for C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>ON·CONH<sub>2</sub>: 10.93%

Ca(OH)<sub>2</sub> の適用は酸アミドを分解するが MgO 法は殆ど影響のない事が認められた。

### 結 論

Pyrrolidonoil-glutaminyl-alanine に対する 3% Ba(OH)<sub>2</sub> による加水分解及び pyrrolidonoil-glutaminyl-glutamine に対する N-NaOH による加水分解の方法をこれらの物質の關係化合物につき試験した処、3% Ba(OH)<sub>2</sub> を用い 100°C、3 時間の処理の場合は pyrrolidone 環と acid amide との加水分解は完全である。N-NaOH を使用して 28°C 24 時間の加水分解法にては、acid amide 基は充分分解するが pyrrolidone 環はその殆ど半量が分解するに過ぎないことを認めた。又この際 diketopiperazine 又は glycyl-glycine 等は著しく加水分解を受けたにもかかわらず、pyrrolidonoil-glutaminyl-amide はアイゼニン等と同様アルカリ処理後尚ほ peptide 結合が保持され、glutamyl-glutamic acid を殆ど定量的に残存する如き結果を得た。このことは glutamic acid の α 位 COOH の結合力が glutamic acid の γ 位 COOH に於ける結合は勿論他のアミノ酸の間の結合の場合より特に強力であるためと考へられる。



次に acid amide は普通のアンモニア定量法に於ける MgO 法には安定で殆ど分解しないが、Ca(OH)<sub>2</sub> 法によつては 20% の加水分解を来すことを認めた。従つて acid amide とアンモニアの分離定量の際は先づ MgO 法によりアンモニアを定量した後改めて前記の 3% Ba(OH)<sub>2</sub> 法又は N-NaOH 法にて定量しなければならないことを知つた。尚ほ acid amide 定量の際 N-NaOH 法による時は 20°C にて分解時間は 9~10 時間でも可能であることを認めた。

### 文 献

- (1) 大平敏彦：農化 15 370 (1939)
- (2) C. A. DEKKER, D. STONE & J. S. FURTON:

J. Biol. Chem., 181 719 (1949)

- (3) 大平敏彦：農化 16 1 (1940)
- (4) 大平敏彦：農化 16 293 (1940)
- (5) 大平敏彦・今井甲子男：日農化，春季大会発表 (1954)
- (6) E. FISHER: Ber., 34 2868 (1901)
- (7) 実験農芸化学 (上) 108
- (8) 農芸化学分析書 (上) 43

### Summary

For the determination of pyrrolidonoil and acid amide group, Ohira treated pyrrolidonoil-glutaminyl-alanine at 100°C. for 3 hours with 3% Ba(OH)<sub>2</sub> solution in 1940, and Furton and his colabolators treated pyrrolidonoil-glutaminyl-glutamine at room temperature for 24 hours with N-NaOH solution in 1949. In this experiment, the authors examined the activity of the two methods described above for some samples which had been synthesized. The results obtained are as follows:

- 1) It was observed that the method of using 3% Ba(OH)<sub>2</sub> solution is easy and proper for the determination of pyrrolidonoil group.
- 2) It was thought that pyrrolidonoil-glutaminyl-amide changed quantitatively into glutamyl-glutamic acid when the method of hydrolysis with 3% Ba(OH)<sub>2</sub> solution was carried out. From this fact, it is thought also that the peptide linkage bound by α COOH group of glutamic acid is stronger than the peptide linkage of other amino acids.
- 3) Acid amide was hydrolysed completely by the method of using either 3% Ba(OH)<sub>2</sub> solution or N-NaOH solution.

More over, the authors examined the methods of quantitative analysis of ammonia for the analysis of acid amide, and found that 20% of acid amide was decomposed by the method of using Ca(OH)<sub>2</sub> but a very small amount of acid amide was decomposed by the method of using MgO. (Laboratory of Highpolymer, Faculty of Textile and Sericulture, Shinshu University)