

o-ジアシルベンゼンとアミノ酸および皮膚との反応

南谷 晴子・前川 悦朗

工業化学科

((1977年9月1日受理))

Reaction of *o*-Diacylbenzenes with Amino Acids and Human Skin

Seiko NAN'YA and Eturō MAEKAWA

Department of Engineering Chemistry

(Received September 1, 1977)

o-Acetylbenzophenone [1] and *o*-diacetylbenzene [2] show respectively bluish green and bluish violet color by the reaction with human skin. Under 24 amino acids, only L-cysteine gives an analogous coloration with [1] and [2] when contrasted with human skin. Reflection spectra of human skin with [1] or [2] were compared with uv spectra of L-cysteine and [1] or [2].

From the reaction mixture of [1] and L-cysteine or *S*-methyl-L-cysteine deep blue pigments, C₃₂H₂₈N₂O₂SR [4a (R=CH₃), b (R=H)] were isolated. On the basis of their ir, uv, n. m. r. and mass-spectra and elemental analysis, the structures of [4a, b] were determined to be 1-(1-carboxy-2-methylthioethyl)- and 1-(1-carboxy-2-mercaptoethyl)-5,5'-diphenyl-3,4;3',4'-dibenzo-2,2'-pyrromethene respectively.

1. 呈色反応

o-アセチルベンゾフェノン [1] および *o*-ジアセチルベンゼン [2] は人間の皮膚に付着すると数時間後にそれぞれ青緑色および青紫色を呈する。¹⁾ この呈色は皮膚の構成成分のアミノ基との反応に基づくものと推定し、比較

Table 1 Color Reaction of *o*-Acetylbenzophenone [1] with Amino-Acids^{a)} and Human Skin

Amino-acids	Color after 24 hrs	λ_{\max} (nm)
Cys	light yellowish green ^{b)}	427 620
Val	light blue	619
Ile	light bluish green	622
Lys	deep reddish violet	557 609
Arg	reddish violet	567 613
Ser	light violet	566 619
Gln	light violet	571 623
Asn	light violet ^{c)}	563 626
His	violet red	418 570
Trp	violet red	452 557
Thr	light red ^{c)}	533

Gly	deep reddish violet	530(sh)	557 620
Phe	reddish violet	530	567 619
Ala	reddish violet	525	561 617
Met	violet	526	565 621
Leu	violet	527	568 626
di-Br-Tyr	reddish violet	532	570 625
di-I-Tyr	reddish violet	532	571 630
Human skin	bluish green	390 430	621 645

a) see Table 2

b) On further standing at room temperature, the color of the reaction mixture turned into deep bluish-green with increasing absorption intensity at 620 nm.

c) Color after 5 days

のために蛋白質中のアミノ酸24種との呈色反応を試みた。その結果はつぎの表および写真の通りでその色調は大別すると5つの型に分けられる。なお、L-シスチンおよび第二アミンである L-プロリン、L-ヒドロキシプロリンは全く呈色しない。呈色の著しいのは、グリシン、L-リシン、L-アルギニン、L-アラニンなどであるが、皮膚上での呈色に類似しているのは L-システインの場合のみ

である。

L-システインは皮膚の角質層の主成分であるケラチンに多く含まれることから、[1] および [2] の L-システインとの反応混合物の可視スペクトルと皮膚上の呈色の反射スペクトルを積分球を用いて測定* したものとを比較したところ、吸収極大の位置は一致せず、皮膚上での呈色が遊離の L-システインとの反応によるものとは断定し難いことがわかった。しかし、皮膚上では溶液中での反応に比して空気にふれる率が高く、また室温よりも高い温度を保つので二次的な変化も考えられる。しかも皮膚の組成は単純なものではなく皮膚のポリペプチド中の N 末端残基として存在するシステイン成分が、呈色反応を行うおもしろな場所であるという可能性も十分考慮する必要があると考えられる。

2. 色素の単離

2.1 グリシンとの反応で生成する色素

アミノ酸の中でもっとも簡単でかつ呈色の著しいグリシンと [1] との反応混合物からは青色色素、1-カルボキシラトメチル-1'-カルボキシメチル-5,5'-ジフェニル-3,4; 3',4'-ジベンゾ-2,2'-ピロメテニウム [3] と赤色色素、1,2-ビス(2-カルボキシメチル-3-フェニル-1-イソインドリル)エチレンが単離、確認された。²⁾

一方、[2] とグリシンとの反応でも可視スペクトルと

Table 2 Color Reaction of *o*-Diacetylbenzene [2] with Amino-Acids^{a)} and Human Skin

Amino-acids	Color after 24 hrs	λ_{\max} (nm)
Cys	light greenish yellow	386 404 431 (sh) 576 (w)
	dark violet (after 14 days)	386 404 558 631
Val	reddish violet	553 582
Ile	reddish violet	557 583
Lys	deep reddish violet	510 (sh) 543 583 (sh)
Arg	reddish violet	512 (sh) 546 590 (sh)
His	deep blue	622 642
Trp	red	420 442 530
Gly	deep reddish violet	505 (sh) 534 577
Ala	light violet red	512 542
Leu	reddish violet	515 546 590
Met	reddish violet	513 544 583
Human skin	bluish violet	380 400 550 643

a) To a solution of 5×10^{-5} mol of [1] or [2] in 5ml of methanol were added 10^{-4} mol of amino-acid in a small amount of water and 1 ml of acetic acid and the mixture was left to stand at room temperature.

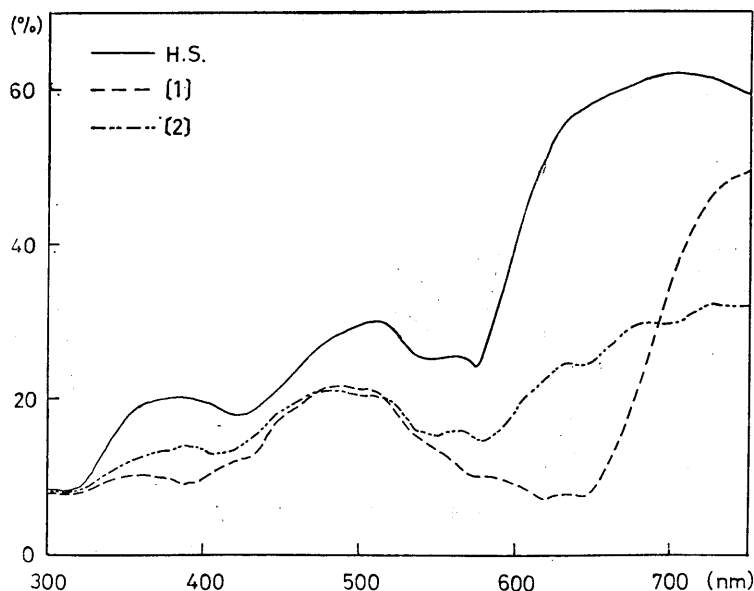


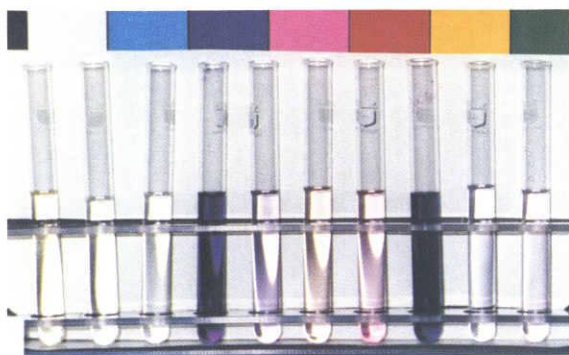
Fig. 2 Reflection Spectra of Coloration on Human Skin (H.S.) with *o*-Acetylbenzophenone [1] and *o*-Diacetylbenzene [2] (after 24 hrs)

* 日本分光工業株式会社の御好意による。UVIDEC—1 型分光光度計を用いた。

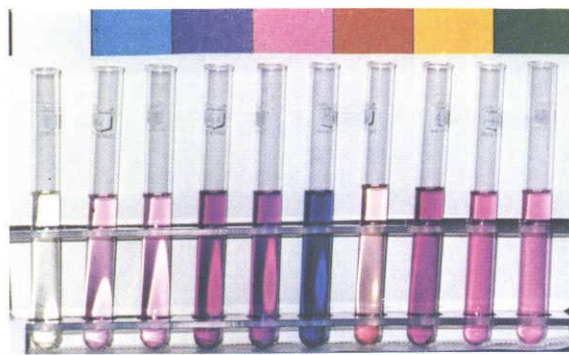
Fig. 1

Coloration of *o*-Acetylbenzophenone [1] and *o*-Diacetylbenzene [2] with Amino-Acids
(from left to right; Cys, Val, Ile, Lys, Arg, His, Trp, Gly, Leu, Met)

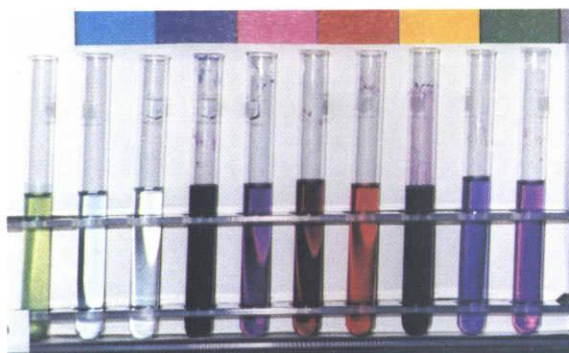
[1] after 5 hrs



[2] after 5 hrs



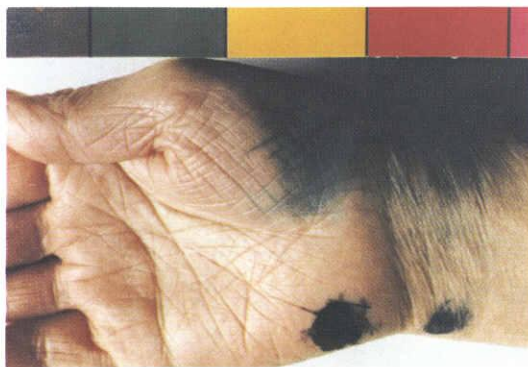
[1] after 70 hrs



[2] after 30 hrs



Coloration of [1] and [2] with Human Skin
after 24 hrs

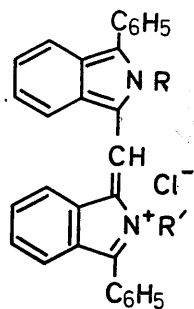


薄層クロマトグラフィーによって青色および赤色色素の存在が確かめられた。しかし、これらの色素は分離精製操作または反応混合物の長時間放置によって、水ならびに種々の有機溶媒に難溶ないし不溶となり純粋な色素を単離することはできなかった。これは〔2〕がその分子中に活性なメチル基を2個もつことから〔1〕に比しより複雑な反応をするためと推定される。

2.2 L-システインならびに S-メチル-L-システインとの反応で生成する青色色素

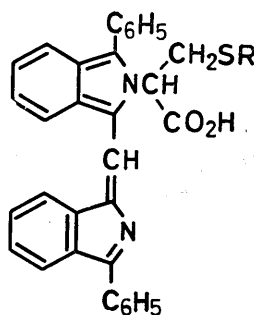
皮膚上での呈色と類似した色を示す L-システインと〔1〕との反応混合物から色素の単離を試みた。分離、精製のためにカラムクロマトグラフィーを行うと、最初に可視スペクトルや薄層クロマトグラムに認められなかつ

た色を示す部分が現われてくる。これは -SH の反応性のためであると推定し、比較のために S-メチル-L-システインを合成して〔1〕との反応を行った。この反応混合物から単離された青色色素〔4a〕は第一アミンと〔1〕との反応から得られる青色色素、1,1'-ジアルキル-5,5'-ジフェニル-3,4;3',4'-ジベンゾ-2,2'-ピロメテニウムクロリド〔5〕³⁾とは異なって反応混合物を塩酸で処理しなくても安定に単離できる。〔4a〕の組成は元素分析値および質量スペクトルから $C_{33}H_{26}N_2O_2S$ であり、その構造は赤外、可視、nmr ならびに質量 (下記) スペクトルを考慮して 1-(1-カルボキシ-2-メチルチオエチル)-5,5'-ジフェニル-3,4;3',4'-ジベンゾ-2,2'-ピロメテンであると推定される。



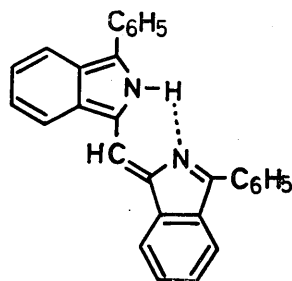
(3) $R:CH_2CO_2H$
 $R':CH_2CO_2^-$
(without Cl^-)

(5) $R=R':CH_3, C_2H_5,$
 $C_6H_5CH_2, (CH_3)_2CH,$
 $C_6H_{11}, CH_2CO_2CH_3,$
 C_6H_5



(4)

	R
a	CH ₃
b	H



(6)

ここで〔4a〕においてはピロメテンの一方の窒素原子には〔5〕の場合と異なって置換基がついていない。しかし S-メチル-L-システインが〔5〕のようなピロメテニウム塩を生成してから N-置換基がはずれたのか、反応の際に S-メチル-L-システインが分解してアンモニアが生成しこれが反応したのかは明らかでない。なお、〔4a〕の可視スペクトルには特徴があり、メタノール溶液ではアセトン溶液にくらべて吸収極大の位置が著しく長波長側へ移動する ($\lambda_{max}^{メタノール} 546nm \rightarrow \lambda_{max}^{アセトン} 630nm$)。

さきに述べたように L-システインとの反応で得られる青色色素は分離、精製に困難が多いが、得られた青色色素の一つは収量が非常に少ないけれども、可視スペクトルが〔4a〕と同様に溶媒によって著しく異なること ($\lambda_{max}^{メタノール} 536nm \rightarrow \lambda_{max}^{アセトン} 614nm$) ならびに赤外や質量スペクトルの特徴から〔4b〕の構造式をもつと推定される。すなわち、質量スペクトルを比較すると

〔4a〕 m/e 470 ($M^+ - CO_2$)

m/e 468 ($M^+ - CO_2H - H$) [$>N-CH=CH-SR$]⁺

m/e 422 ($M^+ - CO_2H - SCH_3$) [$>N-CH=CH_2$]⁺

〔4b〕 m/e 456 ($M^+ - CO_2$)

m/e 454 ($M^+ - CO_2H - H$) [$>N-CH=CH-SR$]⁺

m/e 422 ($M^+ - CO_2H - SH$) [$>N-CH=CH_2$]⁺

となり、フラグメンテーションの特徴がよく一致する。

なお、これらの青色色素〔4a, b〕の生成の際には〔1〕とアンモニアとから得られる青色色素、5,5'-ジフェニル-3,4;3',4'-ジベンゾ-2,2'-ピロメテン〔6〕¹⁾がかならず生成するのが認められた。〔6〕の吸収極大の位置も溶媒によって大きく変化する ($\lambda_{max}^{メタノール} 583nm \rightarrow \lambda_{max}^{アセトン} 583nm$)。〔6〕の場合は酸を加えなければメタノール中でも吸収極大の位置はほとんど変わらない ($\lambda_{max}^{アセトン} 580nm \rightarrow \lambda_{max}^{アセトン-HOAc} 627nm$)。これは〔6〕が分子内水素結合をつくっており窒素原子のまわりの電子分布は

メタノールの酸性によってはほとんど影響を受けないためと考えられる。一方、ピロメテニウム塩〔5〕の吸収極大は溶媒を変えても（アセトン、メタノールおよびこれらに酸を加えた場合）移動しない。

また、グリシンと〔1〕とから得られた青色色素〔3〕は〔5〕と類似の構造をもち、〔5〕のようにクロリドではなく分子内塩をつくっていることが確かめられた。この〔3〕の可視スペクトル ($\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH-HOAc}}$: 621nm, 297nm, 273nm) と〔4a, b〕のそれ（実験の部）とを比較して〔4a, b〕はアセトン中では一方の窒素原子のところに非共有電子対が存在するが、メタノール中ではその酸性のために N^+H となり〔3〕と同じ共役系をもつものと考えられる。

3. 実験

3.1 S-メチル-L-システインの合成⁴⁾

L-システインの塩酸塩を水酸化バリウム水溶液に溶かし、室温で硫酸ジメチルを作用させてS-メチル-L-システインを得た。mp 241~243°C（含水エタノールから再結晶）（文献値⁴⁾: 240°Cで褐色、248°Cで分解）。

3.2 1-(1-カルボキシ-2-メチルオエチル)-5,5'-ジフェニル-3,4:3',4'-ジベンゾ-2,2'-ピロメテン〔4a〕

〔1〕560 mg を90%含水エタノール60 ml に溶かし、S-メチル-L-システイン675 mg と酢酸2 ml を加え室温で放置する。30日後、未反応のS-メチル-L-システインを濾別してからカラムクロマトグラフィーを行う。シリカゲル（Mallinckrodt, 100メッシュ）を用い最初にベンゼンで溶出する部分から〔6〕が得られた。ベンゼン-クロロホルム（1:1）で溶出する副生成物を除いたあと、3%のメタノールを含むベンゼン-クロロホルムで溶出する青色部から40mgの〔4a〕が得られた。mp 158~160°C。

分析値 C76.34%, H5.52%, N5.06%, O7.18%, S6.50%,

$\text{C}_{33}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_2\text{S} \cdot 1/3\text{H}_2\text{O}$ としての

計算値 C76.13%, H5.17%, N5.38%, O7.16%, S6.16%

$\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ (nm): 630 ($\epsilon=67300$), 577 (sh) ($\epsilon=29800$), 299 ($\epsilon=18200$), 270

$\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH-HOAc (9-1)}}$ (nm): 630 ($\epsilon=75600$), 299 ($\epsilon=14900$), 275 ($\epsilon=16800$)

$\lambda_{\text{max}}^{\text{Zn}^{2+}}$ (nm): 546 ($\epsilon=50500$), 375

NMR (CDCl_3 中) (δ): 12.5 (br, 1H, カルボン酸), 9.1~6.7 (m, 19H 芳香族およびこれに共役したメチン), 5.73~5.27 (m, 1H, $>\text{N}-\text{CH}$), 3.78~3.27 (m, 2H, $-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{S}-$), 1.53 (s, 3H, SCH_3)

IR (cm^{-1}): 1690 ($\nu_{\text{C}=\text{N}}$), 1610 と 1420 (ν_{CO})

3.3 1-(1-カルボキシ-2-メルカプトエチル)-5,5'-ジフェニル-3,4:3',4'-ジベンゾ-2,2'-ピロメテン〔4b〕

〔1〕560 mg のメタノール溶液 (50ml) に L-システイン605mg を5 ml の水に溶かしたものと同量酢酸2 ml を加えて室温で放置する。30日後3.2と同じように処理して〔6〕と〔4b〕2~3mg が得られた。この〔4b〕は薄層クロマトグラムでわずかに不純物が認められ、融点の幅も広いが (mp 160~166°C), 質量スペクトルは前述の如くであり、また可視スペクトルも〔4a〕に類似している。

なお、カラムクロマトグラフィーの際、ベンゼンに不溶の部分が水に溶けて黄緑色を呈するが、これを放置したさいに析出する固体はおもにL-シスチンであった。これは未反応のL-シスチンが精製操作中にL-シスチンに変化したものと推定される。

$\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ (nm): 614, 446 (sh), 381, 360, 295 (sh)

$\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH-HOAc}}$ (nm): 616, 446 (sh), 382, 360, 290

$\lambda_{\text{max}}^{\text{Zn}^{2+}}$ (nm): 536, 405 (sh), 370

IR (cm^{-1}): 1685 ($\nu_{\text{C}=\text{N}}$), 1610 と 1420 (ν_{CO})

また、〔4b〕と〔6〕のほかにもう一種の青色色素が単離されたが、収量が非常に少ないためまだ構造を確かめるにはいたっていない。その赤外および可視スペクトル（溶媒をかえても吸収極大の位置は変わらない）から〔3〕か〔5〕の構造で-SHのところでは変化が起つたものと推定される。

本論文中的アセチルベンゾフェノンとアミノ酸との反応についてはその一部を日化1977, 1750に発表した。

文 献

- (1) E. Maekawa, Y. Suzuki, S. Sugiyama, Chem. Ber., 101, 847 (1968)
- (2) 南谷, 河崎, 城戸, 前川, 名工大学報 27, 151 (1975)
- (3) 南谷, 前川, 日化, 1974, 1953; 1975, 1535
- (4) V. du Vigneaud, H. S. Loring, H. A. Craft, J. biol. chem., 105, 481 (1934)