

メチル α -D-アルトロシドのメタノリシス に対する安定性について

藤 原 剛*

Stability of methyl α -D-altroside for a methanolysis

Tsuyoshi FUJIWARA

(1977年9月30日受理)

序 言

多糖類を構成する糖類の組成の分析には、現在ガスクロマトグラフィー (GLC) が多用されている。糖類の GLC は構成単糖へ分解する方法によって、酸加水分解の後適当な誘導体 (TMS, TFA等) に導いて GLC を行なう方法と多糖類を直接メタノリシスする方法に大別される。

酸加水分解の場合、そのグリコシド結合の切れる速度や遊離した糖の分解速度に相当の差があり、しかもかなりの量の糖の分解も避けがたい。一方、メタノリシスの場合は中性糖、アミノ糖、シアル酸ともかなり安定であり(1)操作も簡便である。メタノリシスを行なった場合、おのおのの構成糖は一定比率の α , β -ピラノシド及びフラノシドの混合物を生じ、それぞれが GLC 上で一定の保持時間を有するのでそのパターンから同定、定量を行なうことができる。

メタノリシスには一般に 2.5~5% のメタノール性塩化水素中で 80~100°C, 数時間~24時間の条件が用られている (2,3)。これらの条件は主として自然界に広く分布している糖類については詳しく検討されているが、自然界にはほとんど存在しない糖類についての研究は余り進んでいない。そこで、本研究では D-アルトロースを含む多糖類のモデル化合物としてメチル α -D-アルトロシドを選びそのメタノリシスに対する挙動について報告する。

実験方法と結果

I. メチル α -D-アルトロピラノシドの合成

本研究に用いたメチル α -D-アルトロピラノシドは K. N. Richtmyer の方法(4)によって合成した。即ち、メチル 4,6-O-ベンジリデン- α -D-グルコピラノシド 2.5g を *p*-トルエンスルホンクロリドを用いてトシル化し、続いて乾燥メタノール中でナトリウムメチラートで脱トシル化し、メチル 2,3-アンヒドロ-4,6-O-ベンジリデン- α -D-グルコシドに導いた。これをうすい KOH 溶液中で煮沸すると 2,3 位の水酸基の配向が反転して、メチル 4,6-O-ベンジリデン- α -D-アルトロシドが結晶状に得られた。これを脱ベンジリデン

* 自然科学研究所

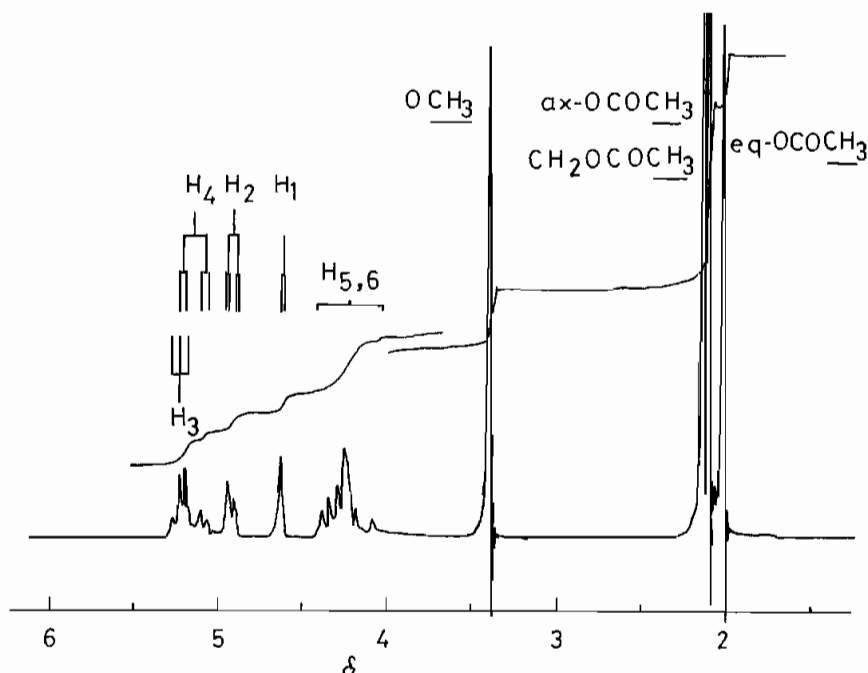


図1. メチル α -D-アルトロピラノシドのテトラアセチル誘導体の NMR スペクトル
測定は CDCl_3 中で日立 R22 型 (90MHz) を用いて行なった。

化してメチル α -D-アルトロシド 203mg をシロップ状に得た。得られたシロップのアセチル誘導体の NMR スペクトルを図 1 に示す。

2.03ppm のシグナルは 1 個の eq-配向のアセチル基を示し、2.13ppm 付近のアセチルシグナルは 3 個分ありそのうちの 2 個は ax-配向のアセチル基であり、他の 1 個は環外のアセチル基を示す。H₁ のシグナルが 4.63ppm と比較的高磁場に現われたこと及び 3.42ppm に OCH₃ 基のシグナルが現われたことはこの物質がメチルグリコシドのテトラアセチル誘導体であることを示している。H₅ のプロトンは H₆ の 2 個のプロトンと A₂B 型のスペクトルを示しその δ 値は H₅ 4.35ppm, H₆ 4.22ppm であり J 値は 6.0Hz であった。このように H₅ のシグナルが高磁場に現われたのは 5 位の水酸基がアセチル化されていない、即ち、ピラノース型であることを示している。J_{1,2}, J_{2,3}, J_{3,4} 及び J_{4,5} がそれぞれ 1.5, 3.5, 3.5 及び 11.5Hz であったことはこの物質が Cl コンホメーションをとっていることを示す。J_{1,2} 値からは OCH₃ 基の配向は不明であるが、脱アセチル体の旋光度が $[\alpha]_D^{25} +125.5^\circ$ (c 4.2, H₂O) であったことは本物質が α 体であることを示している。従って本物質はメチル 2,3,4,6-テトラ-O-アセチル- α -D-アルトロピラノシドである。

II. メチル α -D-アルトロシドのメタノリシスに対する挙動

I で合成したメチル α -D-アルトロピラノシドを用いてメタノール性塩化水素処理を行ない GLC で分析した。実験は、メチル α -D-アルトロピラノシドを各酸度 (1, 2.5 及び 5%) のメタノール性塩化水素 1ml に 0.5mg/ml になるように溶解した。必要に応じて 0.5mg/ml になるようにマンニトールを加え、封管にして、90°C で加熱した。所定時間後永冷し反応を停止させた。これを開管した後、エバポレーターでメタノールを加えつつ乾固をくり返し、塩化水素を完全に取り除いた。これを五酸化リンを入れたデシケー

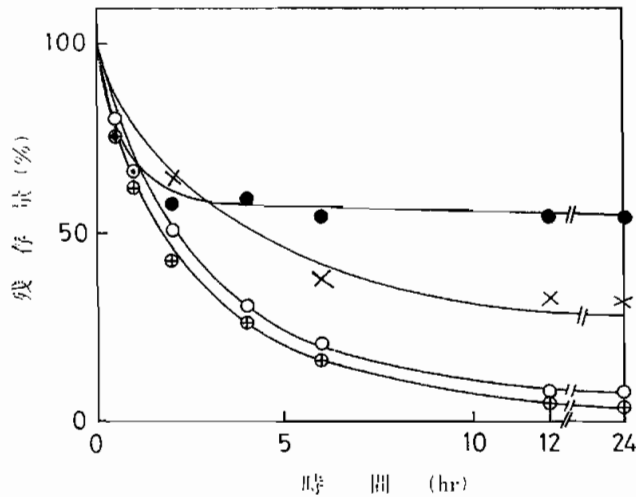


図2. メチル α -D-アルトロピラノシドのメタノリシスに対する安定性

縦軸は最初のメチル α -D-アルトロピラノシド量に対する残存量を百分率で示す。×—×メチル α -D-グルコシド；5%，⊕—⊕メチル α -D-アルトロピラノシド；5%，○—○メチル α -D-アルトロピラノシド；2.5%，●—●メチル α -D-アルトロピラノシド；1%。

ターで完全に乾燥させた後 TMS 化剤 (TMS : HMDS : ピリジン/1 : 2 : 10) 0.2ml を加え30分間室温に放置した。そのうちの $2\mu\text{l}$ を GLC 注入した。GLC は柳本 G-80 ガスクロマトグラフを用い、3%SE30 をコートした Chromosorb W をつめた 2m のガラスカラムでキャリアガス 25ml/min, 180°C の条件でクロマトを行なった。結果を図2に示す。メチル α -D-アルトロピラノシドはメタノリシスの際5, 2.5%では、ほぼ同じ速度で急速に分解がすすみ5時間では約50%が分解した。さらに12時間までには90%が分解した。これはメチル α -D-グルコシドが同一条件 (5%, 12時間) では70%しか分解しないのに比べれば、酸に対してメチル α -D-アルトロピラノシドが著しく不安定であることを示している。しかし、酸濃度が1%では12時間以上たっても40%程度しか分解しなかった。即ち最初の1時間は酸濃度5%の場合と同様の速度で分解したが、1時間を過ぎると分解速度は低下し、2時間後にはほぼ分解は停止した。

D-アルトロースはメタノリシスによって α , β -ピラノシド及びフラノシドの4ピークを与えその量比が peak I (R_G 0.25) 16%, peak II (R_G 0.57) 35%, peak III (R_G 0.65) 33%, peak IV (R_G 0.77) 16%の平衡混合物であることが知られている (3, 5)。そこで、おのおののピークがメタノリシスの時間によってどのように変化するかを各時間ごとに GLC で調べた。結果を図3に示す。酸濃度5%の場合メチル α -D-アルトロピラノシドから他のメチルアルトロシドへの変換は30分後では約60%で1時間後にはほぼ完了した。その量比は peak I 18%, peak II 48%, peak III 18%, peak IV 16%であった。各ピークの量比は文献値(3)とはかなり異なっており、特に peak II, III にその差が著しかった。peak II は実験の出発物質として用いたものと同じメチル α -D-アルトロピラノシドであるが、この量比は反応時間にかかわらずほぼ一定であるので、出発物質がそのまま残ったのではなく、この量比で平衡しているものと考えられる。peak III は文献(3)では peak II

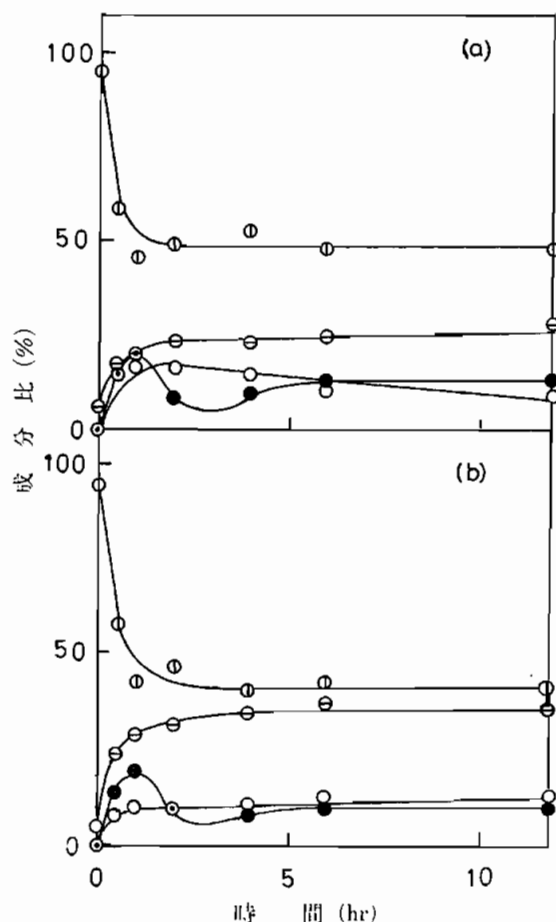


図3. メタノリシスの時間による各成分の量比の変化
 (a)酸濃度5%, (b)酸濃度1%, \ominus — \ominus peak I,
 \square — \square peak II, \bullet — \bullet peak III, \circ — \circ peak IV

とともに主ピークを構成しているが、本実験では小ピークとなった。反応時間が長くなるにつれて分解が著しくなり、各ピークとも絶対量は減少したが、各ピークの量比はあまり変化せずほぼ一定に保たれた。しかし24時間の図(図4)では残存するメチルアルトロシドが最初のメチル α -D-アルトロピラノシドの約10%に減少しているため、peak III, IVはめだたなくなり、全体としてpeak I, IIが特に強調されたパターンとなった。酸濃度が2.5%の場合も5%の場合とほぼ同じパターンを示した。酸濃度が1%の場合、他のメチルアルトロシドへの変換は1時間では不充分で2時間後にはほぼ完了した。この場合peak I 34%, peak II 41%, peak III 12%, peak IV 12%の量比を示し、文献値とはかなり異なっていた。しかし、酸濃度5%の場合とはpeak I, IIの量比に多少の変化が認められる以外は非常によく似たパターンになっていた。この各ピークの流出パターンは加熱時間を長くしても大きい変化は認められなかった。メタノリシスの間、いずれの酸濃度の場合でも、peak IIIの成分の量比が時間とともに複雑に変化したがその傾向は同一であった。即ち加熱開始後約一時間で最高に達し、次いで逆に減少し、2~3時間後に最低となり、ふたたび増加し一定値となった。この点については、その原因の解明を含めて、現在検討

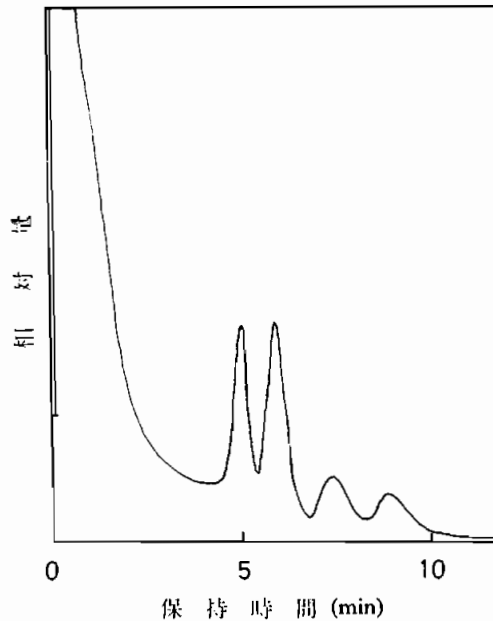


図4. メチル α -D-アルトロピラノシドの GLC における流出パターン

メチル α -D-アルトロピラノシドを 1mg/ml になるよう 5%メタノール性塩化水素に溶解し 90°C, 24時間加熱後 GLC にかけた。

中である。

考 察 と 結 論

メチル α -D-アルトロピラノシドはメタノリシスに対してかなり不安定であり、2.5%メタノール性塩化水素中、5時間の加熱(90°C)でも約50%、10時間では90%以上が分解する。一般にメタノリシスの条件としては、2.5~5%メタノール性塩酸で封管中90~100°C、数時間~24時間(2,3)が用いられるが、メチル α -D-アルトロピラノシドの場合には、分解が進みすぎ不適當である。酸濃度が1%の場合は、2時間以上であれば加熱時間とは無関係に約50%の分解にとどまりそれ以上は分解しない。従ってアルトロースを含む糖のメタノリシスには酸濃度を1%程度にすることが必要である。

メチル α -D-アルトロピラノシドはメタノリシスによって4成分を与えたが、それらは遊離のアルトロースの場合(3)と同様、 α 、 β -ピラノシド及びフラノシドであると考えられる。一般にフラノース型の糖類は酸に対して不安定であり、例えばフラクトースは2.5%メタノール性塩化水素、90°C、5時間では完全に分解される。従って酸濃度が2.5%以上の場合、生成したアルトロフラノシドが酸に対して不安定であるので急速に分解されるものと考えられる。 α 、 β -ピラノシド及びフラノシドの間には一定の平衡関係が成立しているから、フラノシドの分解が進めば、結果的にメチル α -D-アルトロピラノシドの分解が進むものと考えられる。各時間ごとの各ピークの流出パターンがあまり大きく変化しなかったという事実は4種のアルトロシド間には一定の平衡関係が成立していることを示している。アルトロースはメタノリシスによってかなりの量のフラノシドを生成するのに対し、

フラノシドをほとんど生成しないメチル α -D-グルコシドは比較的安定である事は、この考えが正しいことを示している。

メチル α -D-アルトロシドのメタノリシスの結果生成の量比が、従来用いられてきた文献(3)の場合とかなり異なっておりその結果かなり異なった流出パターンを与えた。従って糖の種類同定の際には十分な注意が必要である。この原因は不明であり、現在研究である。しかし peak II についてみると、酸濃度が5%では48%、2.5%では44%、1%では41%と、酸濃度の低下に従って減少し、逆に peak I が増加 (24→33%) し、文献値(3)に近づいて来ている。従って酸濃度の差が平衡状態を変化させたものと考えられる。

文 献

1. R. E. Chambers and J. R. Clamp, *Biochem. J.*, *125*, 1009 (1971).
2. C. H. Bolton, J. R. Clamp and L. Hough, *Biochem. J.*, *96*, 5C (1965).
3. 安藤鋭郎, 寺山宏, 西沢一俊, 山川民夫, 生化学実験法第1巻, p. 229. 朝倉書店 (1974).
4. N. K. Richtmyer, *Methods in Carbohydrate Chemistry*, Vol. 1, p. 107, ed. by R. L. Whisler and M. L. Wolfrom, Academic Press (1962).
5. T. Yamakawa, N. Ueta and I. I. Ishizuka, *Japan J. Exp. Med.*, *34*, 231 (1964).

Summary

1. Methyl α -D-altroside was unstable for the treatment with methanolic hydrogen chloride when acid concentration was 2.5% or 5.0%. In these cases 50% of initial amount was degraded within 5hr and only few percents were remained after 12hr. In contrast to these facts, methyl α -D-altroside was degraded only 50% after 24hr when 1% of methanolic hydrogen chloride was used. Therefore, the use of 1% methanolic hydrogen chloride was needed to hydrolyze a polysaccharide containing altrose.

2. The elution pattern of each peak of methanolizate of methyl α -D-altroside on GLC was different from reference (3). Therefore, enough care was needed to determine the kind of sugar and sugar content.