技術ノート

アルキル β -フルクトフラノサイド調製の改良法

久島 繁* 新井 勇治*

An Improved Preparation of Methyl and Ethyl β -Fructofuranosides

Shigeru HISAJIMA* and Yuji ARAI*

* Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, Tokyo University of Education
(Komaba Meguro-ku, Tokyo Japan 153)

Bacon's method was modified for the large scale preparation of alkyl β -fructofuranosides.

A mixture containing invertase, sucrose and alkyl alcohol was incubated at 20°C for 2 hr. The reaction product was chromatographed on carbon-celite column with deionized water and 1.5% ethanol. The eluate which contained mainly alkyl β -fructofuranoside was purified by ion exchange chromatography on Dowex-1, borate form. Under these conditions, purified alkyl β -fructofuranoside, the yield of which ranged from 600 to 800 mg, was able to obtain three working days.

The product was homogenous in thin layer chromatography on cellulose. Thin layer chromatography of the acid hydrolysates of the methyl and ethyl β -fructofuranosides revealed the presence of fructose which was only sugar component. Nuclear magnetic resonance analysis of the preparations indicated the presence of methoxyl and ethoxyl group respectively. $[\alpha]_D$ Values of methyl and ethyl β -fructofuranosides prepared were -48.6 , $c=1.5$ and -39.3 , $c=2$ respectively.

アルキル β -フルクトフラノサイドは、インベルターゼの基質として、またその転移作用研究の標準物質として重要な物質である。

従来この種のフルクトフラノサイドは、酵母インベルターゼを用いて、ショ糖とアルコールから酵素的に合成し、カーボン・セライトカラムクロマトグラフィー^{1,2)}あるいはろ紙クロマトグラフィー^{3,4)}により分離、精製して得ていた。しかし、カーボン・セライトクロマトグラフ法では、一度に比較的多量の試料を処理できる反面、分離能が不十分のためその標品は遊離糖が夾雑しており、その純化操作に日数がかかる点に、また後者では、得られる標品の純度は高いが、ごく少量の試料しか処理できないため、労力と操作日数がかかる点に問題があった。

ここでは、比較的多量の処理が可能で、かつ、純化効果のよい精製法の検討を行った結果、メチルおよびエチル β -フルクトフラノサイドについて良い成績を得たので報告する。

フルクトフラノサイドの酵素合成は、BACON ら^{1,2)}の方法に準じて行った。すなわち、結晶酵母インベルターゼ(ペーリンガー社製、1,500単位)、50 ml の 200 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0)、ショ糖 (8.5 g) および 30 ml のメタノールあるいはエタノールを含む酵素反応液を 20°C で 2 時間インキュベートした。反応終了後、その反応液はロータリーエバポレーターを用いて蒸発乾固した。残渣を 50 ml の脱イオン水に溶解し、その中に活性炭 (85 g) およびセライト (85 g) を 500 ml の脱イオン水にけんだくさせた液を加え、攪拌しながら生成物を活性炭に吸着させた。あらかじめ吸着に用いたと同量の活性炭・セライトで作成したベッド (14.5 × 2.5 cm) 上にそのけんだく液を流し込み、初め脱イオン水で、次に 1.5% エタノールを用いて溶出を行った (Fig. 1-A, B)。メチル β -フルクトフラノサイドは単糖に続いて脱イオン水で溶出されまたエチル β -フルクトフラノサイドは単糖溶出後 1.5% エタノールで溶出された。しかし、両フルクトフラノサイドの溶出分画には、なお単糖とショ糖が検出された。このような広径で短長なカラムを用いることで、純化の

* 東京教育大学農芸化学科 (153 目黒区駒場 2-19-1)

Fig. 1. Elution patterns of the reaction products on carbon-celite bed.

(A) methyl β -fructofuranoside, (B) ethyl β -fructofuranoside.

The product on carbon-celite column (14.5 $\times$ 5 cm) was chromatographed with D.W and 1.5% ethanol. Flow rate was approximately 300 ml/hr. Fractions of 100 ml were collected. A hundred μ l of each fraction was measured by Roe's method.

第1段階の操作時間はかなり短縮される(約10~13時間)。

濃縮した溶出液は混入している遊離糖を除くため、ホウ酸型 Dowex-1 イオン交換樹脂 (2.6 $\times$ 22 cm)⁵⁾ カラムを通過させた後、脱イオン水を用いてクロマトグラフィーを行った。溶出ピークの中央分画を集め、ロータリーエバポレーターを用いて蒸発乾固し、さらにメタノールを加え数回蒸発乾固を繰り返して、ホウ酸を除去した後蒸発乾固した。得られた標品は、きわめて粘性の高い液状⁴⁾を呈していた。このイオン交換クロマトグラフィーにより、混存していた単糖およびショ糖は完全に除去できた。ここまでの操作は約3日間で終り、収量は 600~800 mg であった。純度の良い標品の調製できるろ紙クロマトグラフ法と比較すると、調製日数および収量が大幅に改善された。

この標品は、薄層クロマトグラフィー的に単一であった (アビセル SF, ブタノール: 酢酸: 水 = 4:1:2, ブタノール: ピリジン: 水 = 5:5:2)。得られたメチルおよびエチル β -フルクトフラノサイドの酸加水分解物は、薄層クロマトグラフィーでフルクトースの単一スポット

Fig. 2. Elution profiles of β -fructofuranosides on Dowex-1 column.

(A) methyl β -fructofuranoside, (B) ethyl β -fructofuranoside.

β -Fructofuranoside fractions as obtained Fig. 1 on Dowex-1 column in the borate form (2.6 $\times$ 22 cm) was chromatographed with D.W. Flow rate was approximately 15 ml/hr. Fractions of 3 ml were collected. Fifty μ l of each fraction was measured by Roe's method.

を与えた。また核磁気共鳴分析によって、それぞれメトキシ基およびエトキシ基が検出された。得られたメチル β -フルクトフラノサイドの $[\alpha]_D$ は -48.6 ; $C=1.5$ ($[\alpha]_D = -48 \sim -52$)^{1,4)}であり、エチル β -フルクトフラノサイドの $[\alpha]_D$ は -39.3 , $C=2$ ($[\alpha]_D = -42$)⁴⁾で、文献値と良く一致した。

試料の核磁気共鳴分析をしていただきました日製産業、安達泉氏に感謝いたします。

文 献

- 1) J. S. D. BACON and D. J. BELL: *J. Chem. Soc.*, **1957**, 3580.
- 2) J. S. D. BACON: *Biochem. J.*, **50**, xviii(1955).
- 3) 鈴木 恕, 三輪知雄: 酵素研究法, 2巻, 朝倉書店, p.83(1956).
- 4) K. ISHIZAWA, U. IRIKI and T. MIWA: *Seikagaku*, **26**, 348(1954).
- 5) J. X. KHYM and L. P. ZILL: *J. Am. Chem. Soc.*, **74**, 2090(1952).