[農化 第 36 卷, 第 12 号, p.984~988, 1962]

酢酸菌によるフラクトースの酸化 (第 11 報)*

再び 5-オキマルトールの構造について

寺田 治, 鈴木静子, 木下祝郎 (協和醸酵東京研究所)

昭和 37 年 6 月 11 日 受 理

緒 言

Gluconobacter cerinus およびその近縁酢酸菌がフラクトースから 3 種の γ -ピロン化合物を生成し, その 1 つ (pyrone-I, 仮称) が相田等⁽²⁾のイソ麴酸 (6-oxy-2-oxymethyl-pyrone-1,4) と同一物質であることは第 4 報⁽¹⁾に報告したところである. その後上記の構造では説明し難い 2, 3 の性質が見出されたので, さらに再検討した結果, この物質が 5-オキシマルトール (3,5-dioxy-2-methyl-pyrone-1,4) であることを合成的手段によって証明し, 第 9 報⁽³⁾に報告した. ここに合成法によったのは pyrone-I の収量がきわめて低く, γ -ピロン化合物の構造決定の常法であるバリタ分解法に供するに足る量の試料をうるものが困難であったことによるのであるが, その後充分量の試料を集積しうに至ったのでバリタ分解法による構造の再検討をこころみ, 第 9 報⁽³⁾の結果を支持する結果を得たのでここに報告する.

実 験 の 部

近縁化合物である麴酸 (5-oxy-2-oxymethyl-pyrone-1,4) の構造はそのジメチルエーテルがバリタ分解によって acetol methyl ether, methoxyacetic acid およびギ酸を与えることによって決定されたのであるが⁽⁴⁾, その後 Arnstein 等⁽⁵⁾が同位元素を用いて検討した結果によれば, バリタ分解の機構は (i) に示したごとくまずギ酸と 1 種の対称ジケト化合物を生じ, 後者はさらに a または b で開裂して methoxyacetic acid および acetol methyl ether を生ずるといわれる. 従って pyrone-I が 5-オキシマルトール (3,5-dioxy-2-methyl-pyrone-1,4) であれば (ii) に示したとき開裂によって表示のごとき 5 種の開裂生成物を与えるはずである. よって pyrone-I のジメチルエーテルのバリタ分解物について次のごとく分解生成物を検索した.

* Oxidation of Fructose by Members of *Acetobacter*. Part XI. On the Structure of 5-Oxymaltol. By Osamu TERADA, Shizuko SUZUKI and Shukuo KINOSHITA (Tokyo Research Laboratory, Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.)

I. Acetol methyl ether および dioxyacetone dimethyl ether の同定

1. 2,4-Dinitrophenylhydrazone の単離, 元素分析: 第 9 報⁽³⁾記載の方法によって得られた pyrone-I のジメチルエーテル 1.5 g を 40 ml の蒸溜水に溶解し, 5% バリタ水 80 ml を加えて湯浴上で 30 分間還流煮沸すれば微量の無定形沈澱を有する淡褐色透明液 (pH 8~9) を得る. 1 夜放置後水蒸気蒸溜に附して 500 ml の溜分をとり, その半量に過剰の 2,4-dinitrophenylhydrazine の 2 N HCl 溶液 (0.5%) を加えて放置すれば 2,4-dinitrophenylhydrazone (以下 DNP と略記) の黄色結晶性沈澱を得る. 2 N HCl および蒸溜水で数回洗滌後エタノールより再結すれば橙黄色針状結晶を得る. 収量 700 mg (dioxyacetone dimethyl ether-DNP として 57%). ここに得られた DNP は一定の融点を示さず, 再結の度に m. p. を異にし 117~152° の範囲で変動する. 試料の 1 つ (m. p. 117°) についての元素分析値は次に示すごとく acetol methyl ether-DNP (m. p. 162°) と dioxyacetone dimethyl ether (m. p. 128°) との中間値を示す. これは前述の m. p. の変動とともに試料 DNP が acetol methyl ether-DNP と dioxyacetone dimethyl ether-DNP との混合物であることを示唆する.

Anal. Found: C 44.69, H 4.69, N 19.38%.

Calcd. for $C_{10}H_{12}O_6N_4$ (acetol methyl ether-DNP): C 44.77, H 4.51, N 20.88%.

Calcd. for $C_{11}H_{14}O_6N_4$ (dioxyacetone dimethyl ether-DNP): C 44.31, H 4.69, N 18.79%.

2. メトキシル基の定量: 以上の結果から試料 DNP が acetol methyl ether-DNP と dioxyacetone dimethyl ether-DNP の混合物であることが推定されたので, これを裏づける資料の 1 つとして試料 DNP のメトキシル基の定量をこころみた. 方法としては Vieböck-Brecher の容量法⁽⁶⁾を採用した. 器具, 試薬および操作法は文献記載を踏襲した. 定量結果の 1 例を次に示す.

Anal. Found: CH_3O 18.17, 18.32, 18.75%.

Calcd. for acetol methyl ether-DNP: CH_3O 11.57%.

Calcd. for dioxyacetone dimethyl ether-DNP: CH_3O 20.81%.

以上のごとくメトキシル基も acetol methyl ether-DNP と dioxyacetone dimethyl ether-DNP の中間値を示し, 試料が両者の混合物であるという推定を支持する. なお以上のメトキシル基定量結果から計算した試料中の両者の混合比は acetol methyl ether-DNP : dioxyacetone dimethyl ether-DNP = 26.95 : 73.05 であり, これから計算した元素分析値は C 44.44, H 4.65, N 19.33% であって, 前述の元素分析結果とよく一致する.

3. 試料 DNP のクロマト的検討: 試料 DNP が acetol methyl ether-DNP, dioxyacetone dimethyl ether-DNP の混合物であることをより積極的に証明するために両者のクロマト的分別について検討した. ペーパークロマト法はいずれの溶剤によっても満足すべき結果を与えなかったが, シリカゲル-ポリビニールアルコール系のクロマトストリップ法⁽⁷⁾によって両者を明確に弁別しうることがわかった. 方法は文献記載の通り, また展開溶剤としては水飽和ベンゼンが最良であった. 結果はその 1 例を第 1 図に示すごとく試料 DNP は明確に 2 個のスポットに分かれ, その R_F はそれぞれ acetol methyl ether-DNP, dioxyacetone dimethyl ether-DNP に一致する.

第 1 図 試料 DNP のクロマトグラム
(シリカゲルクロマトストリップ法)⁽⁷⁾

展開溶剤: 水飽和ベンゼン (3 回展開)

0. 2,4-dinitrophenylhydrazine

1. 試料 DNP

2. acetol methyl ether-DNP

3. dioxyacetone dimethyl ether-DNP

以上 3 項にわたって述べた実験結果から試料 DNP が acetol methyl ether-DNP, dioxyacetone dimethyl ether-DNP の混合物であることはほぼ確実である.

II. 辛酸の証明 バリタ分解物のアルカリ性水蒸気蒸溜残液を硫酸酸性とし, 硫酸バリウムを濾去した後ふたたび水蒸気蒸溜に附して酸性溜出液 500 ml をとる. $CaCO_3$ で中和後減圧下約 10 ml に濃縮し, 等容のエタノールを添加して放置すれば白色微粒状の結晶性沈澱を析出する. このものは昇汞水溶液と加熱すればこれを還元して甘汞の白色沈澱を生じ, その元素分析値は次に示すごとく辛酸カルシウムに一致する. 即ちここに得られた結晶は辛酸カルシウムに外ならない. 収量約 200 mg (30%).

Anal. Found: C 18.71, H 1.65%.

Calcd. for $Ca(H\cdot COO)_2$: C 18.46, H 1.55%.

第2図 酢酸の検出

展開剤: 1.5N NH_4OH 飽和-*n*-ブタノール

発色剤: 酸性 B.P.B. 液 (B.P.B. 0.05%, クエン酸 0.2%)

1. 試料アンモニウム塩, 2. 酢酸アンモン, 3. 酢酸アンモン

III. 酢酸の証明

上述のギ酸カルシウム結晶を回収した母液に加温下稀 KMnO_4 溶液を滴下して残存ギ酸を分解し, もはや KMnO_4 を脱色せず, 昇汞を還元しないことを確認した後, 硫酸酸性として1夜エーテルで抽出する. 抽出液に数滴の蒸留水を加えてエーテルを溜去すれば酢酸の特臭を有する酸性液を得る. この溶液から酢酸を Ca 塩あるいは Zn 塩として単離することには成功しなかったが, 第2図に示すごとくペーパークロマト上酢酸に一致する R_F を示し, ケト酸, オキシ酸の反応を呈せず, かつ上述の酢酸の特臭を有することから該酸を酢酸と同定した.

IV. メトキシ酢酸の証明

酸性水蒸気蒸溜残液をエーテル抽出し, 少量の蒸留水を添加後エーテルを溜去すれば少量の不揮発酸溶液をうる. 該酸はペーパークロマト上数種の展開溶剤 (*n*-butanol-formic acid-water (4:1.5:1), *n*-butanol-acetic acid-water (4:1:1), *n*-butanol-pyridine-water (3:2:1.5), phenol-water (4:1), *n*-butanol-ethanol-water (5:1:4), ethyl acetate-acetic acid-water (3:1:3)) について標準メトキシ酢酸 (第8報⁽⁸⁾参照) と同一 R_F を示すことからメトキシ酢酸と同定した.

考 察

以上のごとく pyrone-I のジメチルエーテルのバリタ分解中に予想どおり dioxyacetone dimethyl ether, acetol methyl ether, ギ酸, 酢酸およびメトキシ酢酸を検出しえた. この事実は pyrone-I が 5-オキシマルトール (3,5-dioxy-2-methyl-pyrone-1,4) であることを支持するものである.

いま逆に以上の分解生成物から原 γ -パイロンの構造を考察すれば, バリタ分解によってギ酸を生成することはパイロン核の α -C の少くとも一方が未置換であることを示す. 従ってかかる γ -パイロンの構造は (I) の如き一般式で表わしうる. (I) はバリタ分解によってギ酸および (II) のときジケト化合物を生成し, (II) はさらに a または b で開裂して表示のごとき4種の開裂生成物 (2種のケトンおよび2種のカルボン酸) を生ずる. これらのひとつが dioxyacetone dimethyl ether であるためには $A, B=\text{CH}_3\text{O}-$ (a 開裂) または $B=\text{CH}_3\text{O}-, C=\text{CH}_3\text{O}-\text{CH}_2-$ (b 開裂) であることが必要条件である. 即ち原 γ -パイロンの構造は (III) あるいは (IV) でなければならない.

同様に分解物中に acetol methyl ether が存在するためには A, B のいずれかが $\text{H}-$, 他方が $\text{HO}-$ であるか (a 開裂) または $B=\text{H}, C=\text{CH}_2\text{OH}$ あるいは $B=\text{HO}-, C=\text{CH}_3$ (b 開裂) であることが必要である. 即ち原 γ -パイロンの構造は (V)~(VIII) のいずれかでなければならない.

従って, そのジメチルエーテルがバリタ分解によって dioxyacetone dimethyl ether および acetol methyl

ether を同時に与えるとき γ -ピロンの構造は (III)(IV); (V)~(VIII) の 2 群の構造中互いに排反しないこときものであらねばならない. かかる条件に合致する組合せとしては (III)~(VIII) および (IV)~(V) があり, 前者からは (K) (5-オキシマルトール), 後者からは (X) (ハイドロキシマルトール)⁽⁹⁾ が導かれる. 換言すれば pyrone-I は 5-オキシマルトールかハイドロキシマルトールかのいずれかである. しかるに第 4 報⁽¹⁾, 第 9 報⁽⁹⁾ にも述べたごとく pyrone-I (m.p. 184°) はハイドロキシマルトール (m.p. 153°) と m.p. を異にし, また pyrone-I が 2 個のフェノール性水酸基を有すること, ヨードホルム反応が陰性であること等の性質は構造 (K) では説明しうるが (X) では説明しえない. 従って pyrone-I は (K) 即ち 5-オキシマルトール (3,5-dioxy-2-methyl-pyrone-1,4) である.

要 約

Gluconobacter cerinus およびその近縁酢酸菌がフラクトースから生成する 3 種の γ -ピロン中さきに⁽¹⁾ イソ麴酸⁽²⁾ と同定, 報告し, その後合成的手段によって 5-オキシマルトールであることを証明, 報告⁽³⁾ した pyrone-I (仮称) について, バリタ分解法による構造の再検討をこころみ, pyrone-I が 5-オキシマルトールであることを再確認した.

〔補遺〕 著者等の得た 5-オキシマルトールの赤外部吸収 (KBr tablet 法)^(1,2) と相田等⁽³⁾ のイソ麴酸の赤外部吸収が 6.5~7 μ 領域に多少の差異を有し, これがおそらく測定法の差によるものであらうことはすでに述べたが⁽³⁾, Nujol 法によって得られる 5-オキシマルトールの赤外部吸収 (第 3 図) は醱酵, 合成両試料ともに完全に相田等の記載に一致する. 従って既報^(1,3) の諸性質の一致と併せ考えれば, イソ麴酸として報告された物質が 5-オキシマルトールであることは疑問の余地がない.

第 3 図 醱酵および合成 5-オキシマルトールの赤外部吸収 (Nujol 法)
(I) 醱酵による試料 (II) 合成による試料

本研究を通じて元素分析は東大農学部農芸化学教室分析室, 同応用微研第 8 研究室および薬学部中央分析, 赤外部吸収の測定は薬学部中央分析および当研究所湯浅治郎氏によるものである. また研究の進行中東大名誉教授朝井勇宣博士はじめ多数の方々の御教示を得た. 以上の方々に深甚の謝意を表する.

(1) 寺田 治, 鈴木静子, 木下祝郎: 本誌, 35, 1331 (1961).

(2) K. Aida, M. Fujii, T. Asai: *Proc. Japan Acad.*, 32, 600 (1956).

- (3) 寺田 治, 鈴木静子, 木下祝郎 : 本誌, **36**, 623 (1962).
 (4) 藪田貞治郎 : 東京化学会誌, **37**, 1185 (1916).
 (5) H. R. V. Arnstein, R. Bentley : *Biochem. J.*, **62**, 403 (1956).
 (6) 落合英二, 津田恭介, 阪本秀策 : 有機定量分析法, 微量篇, 南江堂, p. 179 (1956); F. Vieböck, C. Brecher : *Ber.*, **63**, 3207 (1930).
 (7) 尾上慶吾 : 日化誌, **73**, 337 (1952); J. G. Kirchner, J. M. Miller, G. J. Keller : *Anal. Chem.*, **23**, 420 (1951).
 (8) 寺田 治, 鈴木静子, 木下祝郎 : 本誌, **36**, 426 (1962).
 (9) F. H. Stodola : *J. Am. Chem. Soc.*, **73**, 5912 (1951).

〔農化 第36巻, 第12号, p. 988~994, 1962〕

ガスクロマトグラフィーによる本邦産牛乳脂肪の 脂肪酸組成に関する研究 (第4報)*

ガスクロマトグラフによる乳脂肪の構成脂肪酸の定量法について

中西武雄, 中江利孝 (東北大学農学部)

昭和37年6月11日受理

ま え が き

牛乳脂肪の構成脂肪酸の定量法は, ガスクロマトグラフィーの登場以来, Patton ら^(1,2), Smith⁽³⁾, Herb ら⁽⁴⁾などによって研究が進められているが, 多数の乳脂肪試料を短時間で分析するには, 迅速かつ正確な定量法が要求される。著者らは前報⁽⁵⁻⁷⁾において, 牛乳脂肪の脂肪酸メチルエステルの調製法とガスクロマトグラフィーによるその分離確認の条件を検討したが, 脂肪酸の定量を目的とする場合には, 特に脂肪酸のエステル化とエステル化試料の回収に正確を期するとともに, ガスクロマトグラフィーの運転において, 各脂肪酸エステルの分離能を高め, かつ可能な限り全脂肪酸を1回の運転条件で正確に分析定量できることが望ましい。本報では, この点を特に考慮して改良を加え, 脂肪酸の定量条件を確立するための実験を行なった。

実 験 方 法

1. 乳脂肪の調製 牛乳の場合は遠心分離したクリームにメタノール-石油エーテル-エーテル (1:5:5) の混液を試料の10倍量加え, 攪拌後, 1夜放置して濾過する。無水芒硝を加えて脱水後溶媒を溜去して乳脂肪を得る。バターは前報⁽⁶⁾と同様にエーテル抽出してバター脂肪を得た。

2. 脂肪酸メチルエステルの調製 乳脂肪からの脂肪酸メチルエステル調製には, *Interesterification* を適用し, 塩酸-メタノール法と苛性カリ-メタノール法による脂肪酸メチルエステル調製の条件を比較検討した。エステル化の方法は次のとおりである。

i) 塩酸-メタノール法 : 前報⁽⁶⁾に準じ, 乳脂肪1gに10倍量の3%塩酸-メタノール液を加え, 種々の時間窒素ガス通気をしながら還流加熱した。

ii) 苛性カリ-メタノール法 : 0.001~0.025 N KOH メタノール液10mlを乳脂肪1gに加え, 窒素通気下で種々の反応時間還流加熱した。反応の完了は前報⁽⁶⁾に従って, 反応液の均質化とグリセリン遊離量の増加の停止から判定した。

上記の方法で得られた反応完了液には, エーテル20mlを加え, まず半飽和食塩水10mlで1回, 次に飽和食塩水で2, 3回エーテル層を洗滌して, 脂肪酸エステルの水層への損失を防ぎながら, 反応触媒とアルコールを除去した。エーテル層を無水芒硝で脱水後, エーテルを45°以下で溜去し, 脂肪酸エステルを調製した。このエステル調製に当たっては, その回収率を調べた。

3. 標準脂肪酸エステルの調製 ギ酸 (C_1), 酢酸 (C_2), プロピオン酸 (C_3), *n*-酪酸 (C_4), *n*-吉草酸 (C_6),

* Studies on the Fatty Acid Constituents of Butterfat in Japan by Gas Chromatography. Part IV. Quantitative Estimation of Fatty Acid Constituents of Milk Fat by Gas Chromatography. By Takeo NAKANISHI and Toshitaka NAKAE (Faculty of Agriculture, Tohoku University)