ホルモースの合成と利用 (第2報)

ホルモースの分別および糖組成について

水野 卓, 浅井正勝, 三崎 旭*, 藤原喜延**

(静岡大学農学部, *大阪大学産業科学研究所, **日立製作所那珂工場)

昭和 46 年 1 月 28 日 受 理

Studies on Synthesis and Utilization of Formose

Part II. Chromatographic Fractionation and Identification of Formose Sugar

By Takashi MIZUNO, Masakatsu ASAI, Akira MISAKI* and Yoshinobu FUJIHARA**

*Faculty of Agriculture, Shizuoka University; *Institute of*

Scientific and Industrial Research, Osaka University;

***Hitachi Co., Ltd., Naka Manufactory*

The sugar composition of formose, that is monosaccharide mixture produced from the dilute formaldehyde aqueous solution at yellowing point in the presence of calcium hydroxide, was investigated by the various methods of chromatography, *i.e.*, paper chromatography of formose, thin-layer chromatography of formose and its phenyl osazone derivative, gas-liquid chromatography of alditol acetate and trimethylsilyl derivatives of formose, and liquid-solid chromatography (sugar-autoanalyzer) of formose sugar. The results were as follows:

Formose was mixture of monosaccharides of various carbon number (aldose and ketose). Hexose was the major component, pentose was the second and triose, tetrose and heptose were the minor components. The following 12 kinds of DL-racemic sugars in the above-mentioned monosaccharide group were detected. Glycerose and diosaccharose as triose; erythrose and threose as tetrose; arabinose and xylose as pentose; mannose, galactose, glucose, gulose, fructose and sorbose as hexose group, respectively. A number of other pending spots or peaks were found on chromatographic patterns of formose.

(Received January 28, 1971)

前報⁽¹⁾において、無機あるいは有機塩基の存在下、水溶液中でホルムアルデヒドがアルドール縮合して糖類(ホルモース)を生成することを確認し、塩基のうちでは $\text{Ca}(\text{OH})_2$ が最良の縮合剤であること、糖生成ピーク(黄化点)が存在すること、ホルモースは各種のヘキソースやペントースなど単糖の混合物であり、その糖組成は使用した塩基の種類に関係なく類似していることなどを明らかにし報告したが、本報告ではホルモースの糖組成を詳しく究明する目的で、ペーパー (PPC), 薄層 (TLC), ガス (GLC), 液体 (LSC) などの各種クロマトグラフ法により、分別し、確認を試み、比較したので報告する。

実験方法および結果

1. 標準糖類

C_3 糖: D-グリセロースは D-フルクトースの四酢酸鉛酸化法により調製した⁽²⁾。 $[\alpha]_D^{15} + 8.5^\circ$ ($c=0.5$, 水)。

C_4 糖: D-エリスロースは D-グルコースの四酢酸鉛酸化法により調製した⁽²⁾。 $[\alpha]_D^{15} - 31.0^\circ$ ($c=0.5$, 水)。

C_5 糖: D-リボース, L-アラビノース, D-キシロースは市販の特級品を使用した。

C_6 糖: L-ラムノース, D-グルコース, D-マンノース, D-ガラクトース, D-フルクトース, L-ソルボースは、いずれも市販の試薬特級あるいは 1 級品を使用した。

C₇ 糖: D-グリセロ-D-グロ-ヘブトースと D-グリセロ-D-イド-ヘブトースは D-グルコースからシアンヒドリン法により合成した⁽²⁾, セドヘブチュロースと D-マンノ-ヘブチュロースは Dr. N. K. Richtmyer⁽³⁾ から, コリトース (D-アルトロ-3-ヘブチュロース) と D-グルコ-ヘブチュロースは奥田拓男博士⁽⁴⁾ から恵与いただいたものを使用した。

2. ホルモースの合成法

前報⁽¹⁾に準じて, 市販ホルマリン (37%, S. G. 1.1141, 500 g, 特級品) 450 ml を水 2 l, メタノール 500 ml とともに三角フラスコにとり, 攪拌しつつ 50°C 湯浴中に保ち, 消石灰末 30 g を加え, 激しく攪拌し黄化点 (約 20 分) に達せしめる。直ちに 20% 硫酸 160 ml で中和, 微酸性にしてから濾過して沈殿を除く。

濾液は炭酸石灰末の過剰で中和後, 活性炭 4~5 g を加えて 80° に 30 分間加温, 濾過する。この濾液を 1/3 容まで減圧濃縮してからアンパーライト IR-120 B (H⁺) カラム (2 l), ついでアンパーライト IRA-410 (OH⁻) カラム (2 l) の順で 4 回反復処理して精製糖液を得た。

この糖液を 60° 以下で減圧濃縮して 80% シラップとし, 実験に供した。このシラップは無色透明, 甘味の強い水飴状で, 水分 20.4%, $[\alpha]_D^{16} 0^\circ$ ($c=5$, 水)。

収量は, 37% ホルマリン 5 kg から 80% シラップ 1411 g で, CH₂O 当り収率はグルコース換算約 53% であった。

3. PPC による分別

Fig. 1 の結果を得た。

4. TLC による分別

Fig. 2 の結果を得た。

Fig. 1. Paper Chromatograms of Formose Sugar.

Filter paper: Toyō No. 50, 40×40 cm.

Development method: multiple one or two dimensional ascending method (30°C, 2 times).

Reagents: *p*-anisidine-HCl-ethanol and phloroglucinol-HCl-ethanol.

S: authentic natural sugars, F: formose sugars.

Di: dioxycetone, Xyl: D-xylose, Gc: D-glycerose, Ara: L-arabinose, deRib: 2-deoxy D-ribose, Glc: D-glucose, Rib: D-ribose, Gal: D-galactose, Rha: L-rhamnose, Man: D-mannose, Ery: D-erythrose, Sor: L-sorbose, Hep: D-heptose, Fru: D-fructose.

Fig. 2. Thin-layer Chromatograms of Formose Sugar.

Thin-layer: Merck kiesel guhr G (0.05 N CH₃COONa), 0.25 mm, 20×20 cm.

Reagent: anisaldehyde-H₂SO₄.

P: purple, G: green, O: orange, YG: yellowish green, V: violet, GG: greenish grey, B: blue.

Fig. 3. Thin-layer Chromatograms of the Phenyl Osazones prepared from Natural Sugars and Formose Sugar.

Fractionation of the formose phenyl osazone:

Formose phenyl osazone (A)

5. TLC によるフェニルオサゾンの分別

(1) 標準糖のフェニルオサゾンの調製: 15 ml 容遠沈管に糖 1 ミリモル, 塩酸フェニルヒドラジン 3 ミリモル, 酢酸ソーダ 3.5 ミリモル, 水 8 ml を加え, 冷却ガラス管をつけ, 沸とう水浴中で 30 分間反応させる。冷却後, 遠心分離 (4000 rpm, 5 分間) し, 母液を捨てる。沈殿を少量のメタノールに熱時溶解し, 水を少しずつ加えて再結し, 結晶は真空デシケーター中で乾燥した。

(2) ホルモースのフェニルオサゾン: 標準糖と同じ方法でホルモース・フェニルオサゾン (A) を調製し乾燥した。(A) をエチルエーテルで処理し, 可溶部 (B) と不溶部に分け, 不溶部を 10 倍容の 80% 熱メタノールに溶解し, 冷却して沈殿するもの (D) と可溶部 (C) に分けた。

(3) TLC による分別: ホルモース・オサゾンを標準糖オサゾンと比較した結果は Fig. 3 のようである。また, 2 次元展開によるホルモース・オサゾンの TLC マップは Fig. 4 のようであった。

(4) TLC-デンシトメトリー: TLC によって分別されたホルモース・オサゾンの各成分の濃度比を, アタゴ光学デンシトマスダーケミック-S 型によって測定し

Fig. 5 の結果を得た。

(5) TLC-削り取り法による分別: TLC によって分別された各スポット成分を, 薄層 10 枚単位で削り取っ

Fig. 4. Thin-layer Chromatogram of the Formose Phenyl Osazone.

Thin-layer: Merck kiesel gel G, 0.25 mm, 20×20 cm.

て集め, スポットごとに熱メタノールで抽出, 濾液を濃縮乾涸して粉末とした. 得られた各スポット成分を再び TLC に供し分別を試み Fig. 6 の結果を得た.

Fig. 5. Thin-layer Chromatogram and Its Densitogram of the Formose Phenyl Osazone.

Thin-layer : Merck kiesel gel G.

Development method : one dimensional multiple ascending method (25°C, 2 times).

Densitometer : Atago densitomaster kemica S, filter 430 mμ, slit 0.5×10mm, range 0.5, chart speed 100 mm/min.

6. GLC による分別

(a) アルデイトールアセテートとして : H. Björndal らの方法⁽⁵⁾に従い, ホルモース (80% シラップ) 20 mg を水 2 ml に溶かし, 水素化ホウ素ナトリウム 40 mg で

Table I. Relative Retention Times (*T*) of Authentic Alditol Acetates, and Formose after Reduction and Acetylation

Authentic alditol acetates	<i>T</i>	Molar response	Component from formose	<i>T</i>	Correspond to
Glycerol	0.56	0.88	1	0.56	Glycerol
Erythritol	0.81	1.00	2	0.82	Erythritol
Threitol	0.85	—	3	0.85	Tetritol
Rhamnitol	1.00	—	4	0.87	Threitol
Fucositol	1.05	—	5	1.14	Ribitol
Ribitol	1.17	—	6	1.18	Arabinitol
Arabinitol	1.18	1.26	7	1.35	Xylitol
Xylitol	1.35	—	8	1.65	Hexitol
Mannitol	1.74	1.29	9	1.74	Mannitol
Galactitol	2.05	1.26	10	1.84	Hexitol
Glucitol	2.24	1.26	11	2.05	Galactitol
			12	2.24	Glucitol
			13	2.47	Hexitol
			14	2.59	Hexitol
			15	3.40	Heptitol
			16	3.58	Heptitol
			17	3.84	Heptitol
			18	4.20	Heptitol
			19	4.66	Octitol ?

Fig. 6. Thin-layer Chromatograms of Each Fraction obtained from the Formose Phenyl Osazone.

Thin-layer : Merck kiesel gel G, 0.25 mm.

Fig. 7. Gas-liquid Chromatogram of Alditol Acetates derived from Formose Sugar.

Apparatus: Hitachi K-53 Gaschromatograph, detector FID.

Column: 200×φ 0.3 cm stainless steel, 3% ECNSS-M on Gas Chrom Q.

Temperature program: 80°→195°C (7.5°C/min).

Carrier gas: N₂ 40 ml/min.

5時間、室温で還元し、過剰の水素化ホウ素ナトリウムをアンバーライト IR-120 (H⁺) により分解と同時に脱カチオンする。溶液を濃縮後、ホウ酸をメタノールとともに繰り返し減圧蒸留してメチルボレートとして除去する。得られる還元物質をピリジン 0.5 ml、無水酢酸 10.5 ml と 100° で2時間加熱してアセチル化し、このままか、あるいは濃縮後クロロホルムに溶かして、J. S. Sawrdeker らの条件⁽⁶⁾に準じた GLC に供した。結果は Fig. 7 および Table I に示した。なお、標準アルディトールアセテートは、標準糖から同操作によって調製した。

(b) TMS-糖として: C. C. Sweeley ら⁽⁷⁾の方法に準じ、ホルモース 100 mg (無水物) を無水ピリジン 10 ml に溶かし、HMDS 2 ml および TMCS 1 ml を加え振り混ぜ、60°~70°C に1~2分加温、そのまま10分放置後、クロロホルム 30 ml と水 30 ml を加えて振り混

ぜ、静置あるいは遠心分離し、上層を捨て、クロロホルム層は水洗を3回反復したのち、クロロホルムを減圧下で留去、真空乾燥し、これをクロロホルムあるいはピリジン 2 ml に溶解、その1~2 μl を GLC に供した。結果は Fig. 8 に示した。なお、内部標準物質は東京化成社の TMS-糖キットから選び、添加に伴うピークの増大をもってチェックした。

7. LSC による分別

ホルモース (80% シラップ) 20 mg を水 0.5 ml に溶解し、日立 034 型液体クロマトグラフ (糖自動分析計) に供した。同条件で標準糖について得たクロマトグラムと比較して同定を試みた。得られた結果を Fig. 9 にまとめた。

考 察

ホルムアルデヒドのアルドール縮合によって生成する

Fig. 8. Gas-liquid Chromatogram of Trimethylsilyl Derivative of Formose Sugar.

Apparatus: Hitachi 063 Gaschromatograph, detector FID.

Column: 200×φ 0.3 cm stainless steel, 3% SE-52 on Chromosorb W, 150°C.

Carrier gas: N₂ 70 ml/min.

2. Erythrose, 4. Arabinose, 5. Xylose, 8. Mannose, Fructose, 10. Gulose, 11. Galactose, Sorbose, 12. Glucose.

Fig. 9. Liquid-solid Chromatogram of Formose Sugar.

Apparatus: Hitachi 034-0004-KLA-3 B type Liquid Chromatograph.

Column: 4.5×50 cm, column temp. 55°C.

Packing: Bio Rad AG 1×2.

Sample: Formose 19.65 mg/0.5 ml.

Eluent: 1. 0.25 M H_3BO_3 , pH 8.2, 365 min.2. 0.60 M H_3BO_3 , pH 10.2.Flow rate { effluent: 15 ml/hr (6.0 kg/cm²).
reagent: 45 ml/hr (5.9 kg/cm²).

Reagent: phosphoric acid+acetic acid+aniline.

Reaction bath temp.: 120°C, reaction coil: ϕ 0.8×23 m.Cell path: 2 mm, wave length: 365 m μ .

Chart speed: 6 cm/hr.

Scale: 0~0.2 expansion.

ホルモースは $C_2 \sim C_8$ 糖のアルドースおよびケトースの各種混合物であることが、主として PPC 法による検索結果から推定されている⁽¹⁾が、ホルモース糖の種類の間定とともに量的な組成を究明することが、ホルモースの生成機作追究上、またホルモースを利用しようとする立場からも望まれている。

ホルムアルデヒドの縮合反応によって生成する糖量がピークに達する黄化点におけるホルモースの糖組成を、遊離糖のまま、あるいはオサゾンやアルディオール・アセテート、TMS-化糖などの誘導体として各種クロマトグラフ法に供し、ホルモースの分別と間定を試みた。

30 余種にもおよぶといわれている炭素数の異なるアルドースやケトースの混合物であるホルモース糖を、正確に分別・間定さらに定量まで行なうことは、現在の糖分析技術では至難のわざである。まず、PPC や TLC による分別を試み、一応 10 余のスポットには分別されるが、相互の分離が不十分である。次に、フェニルオサゾン誘導体としてから TLC による糖の群別を試み、C 数の異なる糖相互は比較的良好な分離が見られるが、C-2 位エピマーと 2-ケトースの関係にある同じ C 数の糖同士が同一オサゾンを与えるので、それらの確認はできない。ホルモース中の単糖を水素化ホウ素ナトリウムで還元して糖アルコールとなし、そのアセテートについて

GLC を実施して、19 種ほどの対応する糖ピークを検出した (Fig. 7)。しかし、この方法では 2-ケトースが排除されて対応するアルドースと区別できない (他のケトースの場合も同じ) 欠点がある。これを補うため、TMS 化したホルモースの GLC による分別を試みたが、ヘキソースやペントース相互間にピークの重なりが見られ、また、検出精度を上げると α -, β -アノマー、ピラノース、フラノースのピークなど 1 種の糖に複数個のピークの出現をみる点などあり、多種類の糖混合体であるホルモースの糖組成の間定にはかえって煩雑となるため、不適当と思われる⁽²⁾。最後に、ホルモースを遊離糖のまま LSC (糖自動分析計) に供し、21 種の糖ピークに分別でき (Fig. 9)、本実験範囲内では最良の分離を示したが、分析に設備と長時間を要する難は免れない。

以上の結果から、ホルモースの糖組成はヘキソースが主要糖を占め、副成分糖としてペントース、微量成分糖としてトリオース、テトロース、ヘプトースなどが存在する。ホルモースの糖成分 (いずれも DL-ラセミ体) としてグリセロース、ジオキシアセトン、エリスロース、スレオース、アラビノース、キシロース、マンノース、ガラクトース、グルコース、グロース、ソルボース、フルクトースなどが間定できた。この他にも未間定の糖スポットやピークが多数検出できたが、今後の問題である。

要 約

ホルモースおよびその誘導体について、各種クロマトグラフ法 (PPC, TLC, GLC, LSC など) を実施し、ホルモースの糖組成を検索し、次の結果を得た。

ホルモースは、ヘキソースを主要糖とし、副成分糖としてペントース、微量成分としてトリオース、テトロース、ヘプトースなどを含む単糖の混合体である。これらのうち、 C_3 糖としてグリセロース、ジオキシアセトン； C_4 糖としてエリスロース、スレオース； C_5 糖としてアラビノース、キシロース； C_6 糖としてマンノース、ガラクトース、グルコース、グロース、ソルボース、フルクトースなどを同定した。これらはいずれも DL-ラセミ体である。

終りに、貴重な七炭糖類の標品を恵与下さった米国 National Institute of Health の Dr. N. K. Richtmyer, 岡山大学医学部教授奥田拓男博士に御礼申し上げます。また、ホルモース生成反応について種々ご教示いただいた独国 Chemischen Institut der Universität Marburg

の Dr. Prof. E. Pfeil ならびに Organische Chemie Institut der Technischen Universität Dresden の Dr. Prof. K. Runge に深謝する。

本報告の要旨は昭和46年5月29日、日本農芸化学会中部支部第50回例会において発表した。

- (1) 水野 卓, 森 貴好, 汐見直行, 中辻博尊: 農化, 44, 324 (1970).
- (2) R. L. Whistler: "Method in Carbohydrate Chem.," Vol. I, Academic Press, 1962, p. 61, 64, 160.
- (3) R. Begbie and N. K. Richtmyer: *Carbohydrate Res.*, 2, 272 (1966).
- (4) 奥田拓男, 小西邦弘: 薬誌, 88, 1329 (1968).
- (5) H. Björndal, B. Lindberg and S. Svensson: *Acta Chem. Scand.*, 21, 1801 (1967).
- (6) J. S. Sawrdeker, J. H. Sloneker and A. Jeanes: *Anal. Chem.*, 37, 1602 (1965).
- (7) C. C. Sweeley, R. Bentley, M. Makita and W. W. Wells: *J. Am. Chem. Soc.*, 85, 2497 (1963).
- (8) A. H. Weiss and R. B. LaPierre: *J. Catalysis*, 16, 332 (1970); A. H. Weiss and J. Shapira: *Hydrocarbon Proc.*, 49, 119 (1970).