UDC 547.457.1'547.466.6

193. 鈴木茂生：糖-アミノ酸結合体の研究（第4報^{*1}） 6-O-(L-Aspartyl)-
D-glucose の二種の異性体の合成とその性質について

Shigeo Suzuki : Studies on Sugar-Amino Acid Compound. IV.
Synthesis of 6-O-(α -L-Aspartyl)-D-glucose and
6-O-(β -L-Aspartyl)-D-glucose.

(Tohoku College of Pharmacy^{*2})

The two isomers of monoglucose aspartate, i.e. 6-O-(L- α -aspartyl)-D-glucose and 6-O-(L- β -aspartyl)-D-glucose, were synthesized and their properties were examined. In both cases, 1,2:3,5-O-dibenzylidene-D-glucofuranose was used as the glucose moiety. For the α -ester, this was condensed with α -benzyl N-benzyloxycarbonyl-L-aspartate in dicyclohexylcarbodiimide and its product was hydrogenolyzed. For the β -ester, the glucofuranose was reacted with 1-benzyl N-benzyloxycarbonyl-L-aspartate 4-chloride and the product was hydrogenolyzed.

Both of these esters were far more stable than the lysine glucose or glycine ester and did not undergo hydrolysis in aqueous solution. However, the esters were easily hydrolyzed in alkaline solution and 50% decomposition in 0.001M solution at pH 10, at 40°, was less than 5 minutes.

(Received October 27, 1960)

前報¹⁾では糖の中性アミノ酸エステルおよび塩基性アミノ酸エステルであるグルコースグリシンエステル(I)²⁾, グルコースリジンエステル(II)³⁾が極めて不安定な性質を有し, 水溶液中では速やかにグルコースおよび構成アミノ酸, その他少量のペプチド等に分解されることを報告した。

Chart 1.

以上の分解反応の原因は (I) および (II) のアミノ基が遊離して塩基性を呈し, そのためエステル結合が切断されるものと思われる。したがってエステルが中性または塩基性アミノ酸で構成されている場合, アミノ酸の種類を問わずその糖エステルの遊離状態における性質は不安定である。しかしながら, 酸性アミノ酸エステル, 例えばグルコース-6-アスパラギン酸モノエステルの2種の異性体, 1-ester ((III)- α とす) および 4-ester ((III)- β とす) はいずれも分子内塩を形成して中性化するために (I) および (II) に比較して安定であり, その単離も可能と思われる。よつて (III)- α および (III)- β の合成を行ない, その性質が以上の推測に適合することを見出したので報告する。

Chart 2 にこれ等の合成経路を示す。(III)- α は前報記載のリジンエステルの合成³⁾ と同一形式であつて 1,2:3,5-di-O-benzylidene- α -D-glucofuranose (以下 DBG と略称する) (IV)⁴⁾ および L-アスパラギン酸 (V) より誘導した 4-benzyl N-bzc^{*3}-L-aspartate (VI)⁵⁾, dicyclohexylcarbodiimide (DCC) (VII)⁶⁾ を 1:2:1 の mol 比

*1 第1報: 本誌 81, 935(1961).

*2 Nankozawa, Odawara, Sendai, Miyagi-ken. 1) 鈴木: 本誌 81, 935(1961).

*3 benzyloxycarbonyl を bzc と略称する。

2) 奥井, 鈴木: 本誌 79, 471(1957).

3) 鈴木: 本誌 81, 935(1961).

4) P. E. Papadakis: J. Am. Chem. Soc. 59, 841(1937).

5) A. Berger, E. Katchalsky: J. Am. Chem. Soc. 73, 4084(1951).

6) R. Herbeck, M. Pezzati: Ber. 71B, 1938(1938).

Chart 2.

にピリジン中に混合溶解, 室温に 48 時間放置することにより対応するエステル (VIII) 白色針晶, mp 105~107°, $[\alpha]_D^{25} + 17.5^\circ$ を 64%の収量で得た. このエステル化反応において (VI) に対応する酸クロライドを (IV) に作用させる方法はその酸クロライドが不安定であるので使用し得ない. この結晶体 (VIII) をメタノール性アンモニアで処理後接触還元を行ない, その反応液を薄紙クロマトグラフィー (以下 PPC と略) にかけたところ, イソアスパラギン (XI) のスポットを検出し, アスパラギン (XII) を認めなかつたのでアスパラギン酸-1-エステル誘導体であることが確実である. ついで (VIII) を 60%メタノール中 20%パラジウム炭触媒, 常温, 常圧下 140 時間接触還元を行ない, 反応液を濃縮, メタノールを加え一方の目的物 (III)-α を mp 160~165°(decomp), $[\alpha]_D^{25} + 33.5^\circ$ の吸湿性無晶形粉末として得た.

また, (III)-β は (IV) に 1-benzyl N-bzc-L-aspartate 4-chloride⁷⁾ (IX) をピリジン溶液中作用させて対応するエステル (X), 白色針晶, mp 149~151°, $[\alpha]_D^{25} + 22.5^\circ$ を 37.4%の収量で得た. ついで (VIII) の接触還元と同一条件を用いて保護基を去り, 反応液を濃縮後メタノールを加えて (III)-β を mp 180~185°(decomp), $[\alpha]_D^{25} + 41.6^\circ$ の白色吸湿性無晶形粉末として得た. (X) を (VIII) と同様にメタノールアンモニア処理, ついで接触還元, PPC を行なつてアスパラギンを検出し, イソアスパラギンを認めなかつたので β-エステルであることが明らかである. Table I に (VIII), (X) の分解成績体の PPC による Rf 値を示す.

以上得られた (III)-α, (III)-β はいずれも フェーリング液を熱時還元し, ニンヒドリンによつて黄色を呈する.

7) M. Bergmann, L. Zervas: Ber. 65, 1192(1932).

Table I. Rf Values of Degradation Products of (VIII) and (X) by Ammonolysis and Hydrogenolysis

Materials developed			Rf values	Color of spots ^{a)}
Samples	Product from (VIII)	(VIII)	0.44	brown → blue
	" (X)	(X)	0.37	violet
Standards	L-Asparagine (XI)	(XI)	0.44	brown → blue
	L-Isoasparagine (XII)	(XII)	0.37	violet

Solvent : phenol·H₂O(5 : 1), filter paper : Toyo Roshi No. 51 A, ^{a)} 0.2% Ninhydrin-BuOH

希酸および希アルカリで容易に加水分解されてグルコースとアスパラギン酸を 1 : 1 の比に生成する。特にアルカリ性では極めて加水分解され易く pH 10 の 0.001M 硼酸緩衝液中、40° で加水分解を行ない、生成したアスパラギン酸をたんす紙電気泳動にかけて未反応物から分離してニンヒドリンで発色させ、その濃度をたんす紙光電濃度計で測定したところ、(III)- α 、(III)- β とも 50% 分解時間は 5 分以内であつた。かつ両者の分解速度に殆んど差異は認められなかつた。Fig. 1 は測定に使用した標準曲線、Fig. 2 は (III)- α 、(III)- β の加水分解曲線を示す。また Fig. 3 は (III)- α 、(III)- β のたんす紙上電気泳動図であつて pH 7.0 で泳動を行なつた場合、これらは原点より僅かに陰極側に移動するのみであつていずれも殆んど中性物質であることを示す。両者とも水溶液として室温に放置すれば一週間程度は殆んど加水分解されないが 50°, 24 時間放置すれば明らかに遊離アスパラギン酸を認めることが出来る。以上の事実は酸性アミノ酸エステルが中性、塩基性アミノ酸エステルに比較してより安定であることを示す。

Fig. 1.

Standard Curve for Quantitative Paper Electrodensitometric Detection of Aspartic Acid

Fig. 2.

Hydrolysis Rate of (III)- α and (III)- β in pH 10 Borate Buffer at 40°
— Δ — (III)- α - - - - - $\circ$ - - - - - (III)- β

Fig. 3. Paper Electrophoresis of (III)- α and (III)- β , Phosphate Buffer (pH 7) 400 V. 8 mA, 3 hr. Toyo Roshi No. 51 A, 6×40 cm

Spray reagents : A—0.2% Ninhydrin-water saturated with BuOH
B—aniline hydrogenphthalate

A
1 (III)- α
2 (III)- β
3 L-aspartic acid

B
1 (III)- α
2 (III)- β
4 D-glucose

生物体より得られた糖-アミノ酸結合体, 例えば teichoic acid⁸⁾ は分子内にアラニンのグルコースエステル結合が存在しているが, この場合は分子内に磷酸基を有し, これがアミノ酸のアミノ基と強固なる分子内塩を形成して結合体分子の安定化に寄与しているといわれている. すなわちアミノ酸と糖の間のエステル結合そのものは著者の実験に示すように著しく不安定であるが比較的分子の大きな化合物で, その他に安定化に寄与する要因があれば天然物に見られるような安定な形として存在し得ることが推定される.

また, グリコプロテインの構造決定の際, ペプチド部分の末端アミノ酸の決定において, 検体を蛋白分解酵素で多糖体-アミノ酸エステルに分解する方法が用いられている. この際, ペプチド末端が酸性アミノ酸であれば終局分解成績体はある程度安定に存在し得るので糖-ペプチド間の結合状態を明らかにし得るが, 中性もしくは塩基性アミノ酸が存在すれば多糖体-アミノ酸エステルが生成しても速やかに分解する結果, その真の結合状態を明らかにすることは極めて困難であろう.

実験の部

6-O-(N-bzc-4-O-benzyl-L-aspartyl)-1,2 : 3,5-di-O-benzylidene- α -D-glucufuranose (VIII) (IV) 3.6 g, (VI) 7 g および (VII) 2.2 g をピリジン 10 cc に溶解, 48 hr 室温放置, ベンゼン 50 cc を加えさらに氷室に一夜放置後吸沬, 残渣をベンゼンで洗い洗液, 沬液を合わせ dil HCl, NaHCO₃ 水, 水の順に洗い Na₂SO₄ で乾燥, 沬過, ベンゼンを減圧留去, 残渣を EtOH で再結, 白色針晶 4.3 g, 64%, mp 105~107°. $[\alpha]_D^{25} +17.5^\circ$, (c=5.00, l=1.0, AcOEt). C₃₉H₃₇O₁₁N Anal. Calcd. C 67.33, H 5.32, N 2.01. Found C 67.26, H 5.26, N 2.40.

6-O-(N-bzc-1-O-benzyl-L-aspartyl)-1,2 : 3,5-di-O-benzylidene- α -D-glucufuranose (X) (IV) 3.0 g をピリジン 50 cc に溶解, -10° に冷却, この溶液に Bergmann 等の方法にしたがつて調整した (IX) (対応する酸 3.6 g, PCl₅ 2 g を用いた) の 50 cc 無水 Et₂O 溶液を徐々に加え一夜放置, 水 500 cc に注ぎ Et₂O 抽出, Et₂O 層を dil HCl, NaHCO₃ 水, 水の順で洗い Na₂SO₄ で乾燥, 減圧で溶媒を去り残渣を少量の MeOH に溶解, 氷室に 3 日放置, 析出した白色固形物を沬取, MeOH で再結. 白色針晶 2.1 g を得. 収率 37.4%, mp 149~151°. $[\alpha]_D^{25} +22.5^\circ$ (c=2.0, l=1.0, MeOH). C₃₉H₃₇O₁₁N Anal. Calcd. C 67.33, H 5.32, N 2.01, Found C 66.90, H 5.33, N 2.19.

(VIII) より (XI) および (X) より (XII) の生成 (VIII), (X) 各 50 mg を 0° で NH₃ 飽和 MeOH 20 cc に加え 48 hr 放置, 得た均一溶液を減圧濃縮, 残渣を 60% MeOH 30 cc にそれぞれ溶解, 20% Pd-C 触媒 0.5 g を加え 4 hr 常圧常圧下で接触還元, 触媒を沬去, 沬液を減圧濃縮, PPC を行なう. 溶媒, フェノール・水 (5:1), 東洋沬紙 No. 51 A, 下端より 5 cm を原点として 30 cm 展開, 風乾後 0.2% ニンヒドリン-BuOH 溶液で発色, 得たスポットの R_f 値を Table I に示す.

6-O-(L- α -Aspartyl)-D-glucose (III)- α . (VIII) の接触還元 (VIII) 2.0 g の細末を 60% MeOH 250 cc に懸濁, 20% Pd-C 2 g と共に常圧, 常圧下 140~150 hr 接触還元, 触媒を沬去, 減圧濃縮, シンラップとし, MeOH 50 cc を加える. 白色沈殿析出, 一夜氷室に放置後遠心して集め減圧乾燥, 少量の水に溶解, 再び MeOH で沈殿させ遠心分離, P₂O₅ 上で減圧乾燥, 吸湿白色無晶形物質 200 mg を得, mp 160~165°(decomp) (140° 付近より徐々に褐変, 微量融点測定器使用). $[\alpha]_D^{25} +33.5^\circ$ (c=1.50, l=1.0, H₂O). C₁₀H₁₇O₉N·2H₂O Anal. Calcd. C 36.25, H 6.64, N 4.22. Found C 36.72, H 6.57, N 4.55.

6-O-(L- β -Aspartyl)-D-glucose (III)- β . (X) の接触還元 (X) 2.0 g を (VIII) の接触還元と全く同一条件で処理, 吸湿性白色無晶形物質 300 mg を得, mp 180~185°(decomp). $[\alpha]_D^{25} +41.6^\circ$ (c=1.20, l=1.00, H₂O). C₁₀H₁₇O₉N·2H₂O Anal. Calcd. C 36.25, H 6.64, N 4.22. Found C 36.70, H 6.74, N 4.52.

(III)- α および (III)- β の沬紙上電気泳動 Fig. 3 記載の条件で泳動, 発色を行なう. 原点より陰極側 5 mm の部分にニンヒドリン, AHP^{*4} 両試薬で発色するスポットを認めた. 標準のアスパラギン酸は陽極側に 21 mm 移動. (III)- α , (III)- β 体とも泳動距離に差異を認めない.

(III)- α および (III)- β の加水分解度の測定 (A)-標準曲線の作製: L-アスパラギン酸の 10⁻² M 水溶液を調製, これを Fig. 1 に示す希釈濃度勾配にし, その 0.01 cc ずつを pH 6.8 の H₃PO₄ 緩衝液 (Clark-Lubs 緩衝液系列にしたがう), 東洋沬紙 No. 51 A, 12×40 cm を用い初電圧 430 V, 定電流 12 mA で 2 hr 泳動, 風乾後前述ニンヒドリン試薬で注意して加熱発色, 吸光度を測定, Fig. 1 の標準曲線を得. (B)-加水分解速度: (III)- α , (III)- β 各 3.0 mg を予かじめ 40° に加温した pH 10 の緩衝液 (Clark-Lubs 系列) に溶解, 各々 10 cc とし, 40±2° に保つ. Fig. 2 に示す時間毎に 0.01 cc ずつを採取, これを前述標準曲線作製の場合と同一条件で電気泳動, 最後の検液をスポットした後なお 1 hr 通電, 沬紙を乾燥後ニンヒドリン試薬で発色, 吸光度を測定, Fig. 2 の結果を得, すなわち反応開始後 4~5 min で 50% が分解し, 30 min で完全分解を示す.

加水分解液中のグルコースの定量 加水分解速度測定に使用した残液 5 cc ずつをとり, Somogyi 法でグル

*4 aniline hydrogenphthalate.

8) J. Baddiley, J.G. Buchanan: Nature 184, 247(1959).

コース量を測定, 0.005N $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ $F=1.021$ を用い対照液滴定値 24.68 cc, (III)- α 分解液滴定値 18.14 cc, (III)- β 分解液 18.21 cc を得, よつて (III)- α , (III)- β 各 3.0 mg 中のグルコース含量は 1.80 mg および 1.60 mg. 理論量 1.73 mg に近似の値を得.

本研究を実施するに当たり終始御懇篤な御指導を賜つた東京大学 浮田教授, 東北大学 奥井教授に厚く御礼申し上げます. また, 元素分析を施行された東京大学薬学部中央分析室 賀川氏, 東北大学非水溶液研究所 遠藤氏に謝意を表します.

東北薬科大学

UDC 547.94.02 : 582.671

194. 富田真雄, 渡辺恭男, 古川 宏 : ハス *Nelumbo nucifera* GAERTN. の
アルカロイド (第2報^{*1}) Nornuciferine の構造

Masao Tomita, Yasuo Watanabe, and Hiroshi Furukawa : On the Alkaloids
of *Nelumbo nucifera* GAERTN. II. The Structure of Nornuciferine.

(Faculty of Pharmacy, Kyoto University^{*2})

Roemerine, nuciferine, and nornuciferine, a nornuciferine, a new aporphine-type tertiary phenolic base, were isolated from the leaves and petioles of domestic lotus, *Nelumbo nucifera* GAERTN. (Japanese name, "Hasu").^{*1} The composition of this base corresponded to $\text{C}_{18}\text{H}_{19}\text{O}_2\text{N}=\text{C}_{16}\text{H}_{12}(\text{O}-\text{CH}_3)(\text{OH})(\text{N}-\text{CH}_3)$ and O-methylnornuciferine was found to be entirely identical with nuciferine (1,2-dimethoxyaporphine) (I). Consequently, it was found that the formula (II) or (III) would be forwarded for nornuciferine.

In the present series of work, the product obtained by degradation of O-ethyl-nornuciferine, methoxy-ethoxyphenanthrene, was proved to be 3-ethoxy-4-methoxyphenanthrene (XVb) and, consequently, the structure of nornuciferine was established as 1-methoxy-2-hydroxyaporphine (III).

(Received October 28, 1960)

前報^{*1}で著者らは日本産ハス *Nelumbo nucifera* GAERTN. (Nymphaeaceae) の葉部および葉柄部より aporphine 型塩基である roemerine, nuciferine および文献未記載の一新第三級フェノール性塩基 nornuciferine を単離した. そしてこの塩基は無色柱状結晶, mp 195~196°, 組成式 $\text{C}_{18}\text{H}_{19}\text{O}_2\text{N}=\text{C}_{16}\text{H}_{12}(\text{OCH}_3)(\text{OH})(\text{NCH}_3)$, $[\alpha]_D -265^\circ$ (CHCl_3) を示す. さらに nornuciferine をジアゾメタンでメチル化した O-methyl 体が, すでに Arthur 等¹⁾によつて香港産ハスより単離されている nuciferine (I) と完全に一致, 一方 nuciferine はすでに 1,2-dimethoxyaporphine であることが確認されていることから新塩基 nornuciferine の構造は (II) または (III) のいずれかで示されることを報告した. 今回著者らは新塩基 nornuciferine の構造を種々検討した結果, その構造が (III) 式で示されることを確認したのでここに報告する.

(I) $\text{R}_1, \text{R}_2=\text{CH}_3$

(II) $\text{R}_1=\text{CH}_3, \text{R}_2=\text{H}$

(III) $\text{R}_1=\text{H}, \text{R}_2=\text{CH}_3$

^{*1} 第1報 : 本誌 81, 469(1961).

^{*2} Yoshida-konoe-cho, Sakyo-ku, Kyoto.

1) H.R. Arthur, H.T. Cheung : J. Chem. Soc. 1959, 2306.