薬 学 雜 誌
YAKUGAKU ZASSHI
83 (10) 976 ~ 980

UDC 547.483

182. 平坂義信： グルクロン酸とグルコースとの α (1, 4) 重合体に関する研究
(第4報^{*1}) グルクロン酸とグルコースとの α (1, 4) 重合体の合成

Yoshinobu Hirasaka : Studies on the α (1, 4) Polysaccharides of Glucuronic Acid and Glucose. IV. Synthesis of the α (1, 4) Polysaccharides of Glucuronic Acid and Glucose.

(Research Laboratory, Ukima Plant, Chūgai Pharmaceutical Co., Ltd.^{*2})

Direct oxidation of glucose polymers like starch with oxidation agents of nitrogen dioxide system does not afford glucuronic acid polymers. Therefore, amylose (I) was tritylated to tritylamylose (II), its acetylation to acetyltritylamylose (III), and detri-tylation of III gave (poly 2,3-acetyl) amylose (IV). Oxidation of IV with chromium trioxide and potassium permanganate by the method previously reported afforded the objective α (1, 4) polysaccharides (VIII) of glucuronic acid. Oxidation of IV under various conditions or repeated oxidation of IV resulted in termination of the reaction invariably when one-half the amount of primary alcohol group in IV had been oxidized to the carboxylic acid group.

Various properties of VIII were examined and it was found that glucuronic acid residues were distributed randomly, resulting in the concurrent presence of glucose and glucuronic acid polymer structures in the molecule. Intrinsic viscosity was found to be obtained by measuring its viscosity in the glycoll buffer solution (pH 9). The various properties of VIII were found to be different from those of oxidized starch obtained by oxidation with nitric acid.

(Received June 19, 1963)

前報で heptaacetyl- および hexaacetylmaltose を酸化することによって、対応するグルクロン酸とグルコースあるいはグルクロン酸のみの α (1, 4) 二糖類を合成したが、本報では出発原料をアミロースに選定して (poly 2,3-acetyl)amylose を合成し、その酸化によって表題の α (1, 4) 多糖類を得たので報告する。

その合成経路を Chart 1 に示す。またアミロースのようなグルコース重合体の第1アルコールを直接二酸化

Chart 1.

VII : $\text{R}_2 = -\text{CO}_2\text{Me}, -\text{CH}_2\text{OH}$

V : $\text{R}_1 = -\text{CO}_2\text{H}, -\text{CH}_2\text{OH}$

VIII : $\text{R}_2 = -\text{CO}_2\text{H}, -\text{CH}_2\text{OH}$

VI : $\text{R}_1 = -\text{CO}_2\text{Me}, -\text{CH}_2\text{OH}$

*1 第3報 : 本誌, 83, 971 (1963).

*2 Ukima-cho, Kita-ku, Tokyo.

Fig. 1.
Tritylation of Amylose after Presoaking
with Pyridine-Water

—○—○— calcd. TrCl amount 6.0
—△—△— calcd. TrCl amount 4.0

Table I. Oxidation of (Poly-2,3-acetyl) amylose Under Various Conditions

No.	Material	Solvent	Oxidant	Reaction-condition	Yield of V (%)	Glucuronic acid-residue content in V ^{a)} (%)
(1)	IV	AcOH-acetone ^c (1:1)	KMnO ₄ ^{b)}	room temp., 10 days	65	27.0
(2)	IV	AcOH	KMnO ₄ ^{b)}	room temp., 5 days	62	32.3
(3)	(No. 2)	AcOH	KMnO ₄ ^{b)}	room temp., 5 days	total yield 46	50.4
(4)	IV	AcOH	CrO ₃ -KMnO ₄ ^{d)}	10~20°, 3 days	71	50.6
(5)	IV	AcOH	CrO ₃ -KMnO ₄ ^{d)}	10~20°, 3 days	36	50.8
(6)	IV	AcOH	CrO ₃ -KMnO ₄ ^{e)}	10~20°, 4 days	58	50.1

a) Glucuronic acid residue content in V was determined by alkali-titration in acetone-water at 0°. Values show mole/mole percentage.

b) 6.6 mole KMnO₄ were used to 1 mole IV.

c) 2/3 mole CrO₃, 8/3 mole KMnO₄ were used to 1 mole IV. CrO₃ oxidation time; 16 hr.

d) 4/3 mole CrO₃, 8/3 mole KMnO₄ were used to 1 mole IV. CrO₃ oxidation time; 16 hr.

e) 2/3 mole CrO₃, 8/3 mole KMnO₄ were used to 1 mole IV. CrO₃ oxidation time; 36 hr.

窒素系酸化剤で酸化しても第2アルコールの副酸化が不可避免のために目的物を合成できないことについてはすでに述べた。¹⁾

デンプンのトリチル体として Helferich はデンプンと trityl chloride (TrCl) をピリジン中で 32 時間加熱して得た生成物を報告しているが、²⁾ 追試の結果反応時間が長過ぎるために着色がはなはだしく、品質の保証ができなかった。

著者はまずアミロースをピリジンと水の混合液で加熱して膨潤し、³⁾ その後共沸で水を除いたのち trityl chloride と反応させることによって反応時間が短縮され、かつ生成物は着色がなく、分析値も理論値とよく一致した tritylamylose (II) を得ることができた。

Fig. 1 は trityl chloride 使用量と反応時間が変化した場合におけるトリチル化の進行度を測定した結果である。

II はピリジンと無水酢酸で室温でアセチル化したが、Genung⁴⁾ の報告した方法にしたがって生成物中のアセチル基を定量した結果、その値が理論値に達するまでに 2~3 回アセチル化をくり返すことが必要であった。

acetyltritylamylose (III) はピリジン以外の溶媒に不溶なので濃塩酸と氷酢酸の混合溶媒で室温 1 時間反応させて脱トリチル化し、アセトン-エーテルで再結晶して (poly 2,3-acetyl)amylose (IV) を得た。

IV は濃硫酸に溶解後氷水中に滴下しても, tritylalcohol の白濁を生じないこと, IR でベンゼン特有吸収を認

1) 平坂：本誌, 83, 960 (1963).

2) B. Helferich, H. Koester: Ber., 57, 587 (1924).

3) M. Hearon, D. Hiatt: J. Am. Chem. Soc., 65, 2449 (1943).

4) B. Genung: Anal. Chem., 13, 369 (1941).

めないことから完全に脱トリチル化されていることを確認し、またアセチル含有量は測定の結果計算値を与えた。

つぎに第3報で報告した $\text{CrO}_3\text{-KMnO}_4$ による新酸化法を IV に適用した結果 Table I の成績を得、二糖類と同じ酸化条件が IV の場合にも最もよい結果を与えた (Table I, No. (4)). しかし第1アルコールが全体の約 $\frac{1}{2}$ 量酸化されたところで酸化は終了し、IV の KMnO_4 酸化をくり返しても (Table I, No. (3)) 同じ程度の酸化が進行したところで反応は停止した。またさらに酸化条件を強めても明らかに糖の崩壊を認めて収量が激減した (Table I, No. (5)).

こうして得たグルクロン酸残基 約50% を含む酸化物 (V) は、クロロホルム中ジアゾメタンを作用させるとき、そのメチルエステル (VI) を与え、すべての VI の保護基を脱離して目的とする多糖類 (VIII) を得た。

Fig. 2.

Plot of $\log \eta_{sp}/c$ against Concentration of various Oxidized Starches in the Presence of 2% Glycocoll Aq. Solution

- I : 50% MeOH insoluble oxidized starch prepared by Heyn's method.
- II : 99% MeOH insoluble oxidized starch prepared by Heyn's method.
- III : $\alpha(1, 4)$ polysaccharide containing about 50% glucuronic acid residue.
- IV : 99% EtOH insoluble oxidized starch prepared by 50% HNO_3 oxidation of starch.
- V : I in aq. soln. (pH 3.20)

Fig. 3.

Paper Chromatogram of the Acid-hydrolyzates of VIII

solvent : BuOH-AcOH- H_2O

(4 : 1 : 5)

spray reagent : HCl-anisidine

グルクロン酸とグルコースとの $\alpha(1, 4)$ 多糖類 (VIII) はアルカリ滴定で約 $\frac{1}{2}$ 量のグルクロン酸残基含有量を示す白色粉末で、水に易溶であるがメタノール、エタノール、クロロホルム、エーテルなどの溶媒には不溶である。吸湿性はなく、その水溶液は強い酸性を示す。

Somogyi-Schaffer 法⁵⁾ でその還元力を測定すると、等モルの 4-O-(α -D-glucopyranosiduronyl)-D-glucose の有する還元力の約 $\frac{1}{20}$ を示した。^{*4} また紫外部には第2アルコールの副酸化によるオクソ構造の吸収 (280 $\text{m}\mu$)⁶⁾ がないことから、副酸化の生成は殆んど認められない。

^{*4} 硝酸々化デンプンの還元力は同じ測定によるとき VIII の約 20 倍以上を示す。

5) M. Somogyi, A. Schaffer : J. Biol. Chem., 100, 695 (1933).

6) 今井, 平坂 : 本誌, 81, 1362 (1961).

VII の水溶液の粘度をそのまま測定すると Fig. 2 に示すように VII の濃度が 0 に接近するところで還元粘度 η_{sp}/c は無限大に発散するが水酸化ナトリウムで pH 9 に調製した 2% グリコロール水溶液中では Fig. 2 に示すように還元粘度と濃度は濃度 1% 以下で明らかに直線関係を有し、濃度が 0 に到達した場合の極限粘度を求めることができた。

Lunde 等はアルギン酸の酸加水分解による低分子重合体の粘度を水酸化ナトリウム溶液中で測定して極限粘度を求め、⁷⁾ また Owens 等はベクチン酸の粘度を食塩水中で求めて極限粘度を得ているが、⁸⁾ 硝酸酸化デンプンのごとく分子内に副酸化によるカルボニル基を含む重合体では水酸化ナトリウムによる強アルカリ性溶液中で分子が崩壊するため一定した粘度は得られず、食塩水を用いても還元粘度と濃度間に直線関係は成立しなかった。

しかし Fig. 2 に示すように pH 9 に調製した 2% グリコロール緩衝液を溶剤とすると、硝酸酸化デンプンの場合も極限粘度を求めることができ、こうして従来全く未知であったこれらの酸化デンプンの分子鎖長の相互の比較が可能となった。

つぎに VII の分子内でのグルクロン酸とグルコースとの結合様式を推測するために、VII の酸加水分解を実施した。

マルトースやアミロースなどの $\alpha(1, 4)$ 結合は酸によって容易に加水分解され^{9,10)} 0.05 規定の硫酸によるとき煮沸条件では短時間で構成糖のグルコースを生成する。そこで同じ濃度の硫酸で煮沸して分解液をペーパークロマトグラフィーで調べたところ Fig. 3 の結果を得た。

すなわち、比較的短時間で大量のグルコースの生成が認められ、グルクロン酸およびグルクロノラクトンはかなりの分解が進行してはじめて生成した。

もし VII の分子内で約 50% のグルクロン酸残基が (glucuronic acid-glucose)_x の結合様式を大部分有するならば、glucose-glucuronic acid の $\alpha(1, 4)$ 結合はかなり酸加水分解を受け易いと考えられるところから、¹¹⁾ 4-O-(α -D-glucopyranosiduronyl)glucose を生成するか、またはそれがさらに加水分解を受けてグルクロン酸とグルコースが同時に生成するはずである。

したがって以上の結果から VII の分子内ではグルクロン酸とグルコースが大部分ひとつおきに結合しているのではなく、(glucose-glucose)_x 結合をかなり含有していることは明らかである。また逆に VII は全体としてグルクロン酸残基を 50% 含有しているから、当然 (glucuronic acid-glucuronic acid)_x 結合も含んでいることを意味する。

実 験 の 部

Amylose (I) より Tritylamylose (II) の合成 I 40 g. に pyridine-H₂O (1:1, by volume) 800 ml. を加え、ときおり攪拌しながら煮沸水浴上で 1 hr. 加熱後減圧で溶媒を留去する。水を完全に共沸でとり去るために残渣に pyridine 600 ml. ずつ三回加え、その都度煮沸水浴上で 30 min. 加熱攪拌し、溶媒を減圧留去する。残渣を P₂O₅ 上で乾燥したのち pyridine 1 L. および TrCl 400 g. を加え、遮光下攪拌して水浴上 98° で 9 hr. 反応させ、冷却後 MeOH 約 10 L. 中に注入し、析出物を pyridine-MeOH で精製して II 96 g. を得。[α]_D²⁰ +114.9° (c=1.742, pyridine). (C₂₅H₂₄O₅)_x Anal. Calcd.: C, 74.23; H, 5.99. Found: C, 73.24; H, 6.03. trityl 基定量より trityl 化 97.6%。

II 中の trityl 基の定量 II 1 g. を精秤し、乾燥 HCl 飽和 CHCl₃ 溶液 30 ml. を加えて振盪すると II は暫時溶解する。3 hr. 密栓反応後析出物 (amylose) を濾別し、CHCl₃ 液をよく水洗し、CaCl₂ で脱水し、減圧濃縮して固化する。TrOH を P₂O₅ 上減圧乾燥して恒量に至らしめる。

$$\frac{\text{wt. of carbinol} \times 243 \times 100}{\text{wt. of sample} \times 260} = \% \text{ trityl}$$

II から Acetyltritylamylose (III) の合成 II 80 g. を pyridine 560 ml. に溶解し Ac₂O 320 ml. を加えて 25° で 48 hr. 放置後氷水約 10 L. 中に滴下し、水をとりにかえて粉末状に生成物をよく粉碎し、乾燥。これをふたたび pyridine 400 ml., Ac₂O 240 ml. で 25° 48 hr. アセチル化する。氷水から得られる粗製物を pyridine-

7) G. Lunde, H. Kringstad: Kolloid-Zeitschrift, 83, 202 (1938).

8) H. S. Owens, H. Lotzkar: J. Am. Chem. Soc., 68, 1628 (1946).

9) M. L. Wolfrom, E. N. Lassettre: Ibid., 73, 595 (1951).

10) M. L. Wolfrom, J. T. Tyree: Ibid., 73, 4927 (1951).

11) B. Lindberg, et al.: Acta Chem. Scand., 14, 1051 (1960).

MeOH で精製し III 88 g. を得. $[\alpha]_D^{25} + 134.0^\circ$ ($c=1.075$, CHCl_3). $(\text{C}_{27}\text{H}_{25}\text{O}_6)_x$ Anal. Calcd.: C, 72.78; H, 5.67. Found: C, 72.75; H, 5.89.

III より (Poly 2,3-acetyl)amylose (IV) の合成 III 80 g. に AcOH 560 ml. を加え, 水冷しながら conc. HCl 29 ml. と AcOH 130 ml. との混合液を滴下し, 激しく攪拌すると III は HCl-AcOH 滴下終了後約 10 min. で溶解し, 直ちに TrOH が析出する. 1 hr. 振盪後析出物を濾別し, 濾液を Et_2O 3 L. 中に滴下し, 沈殿を濾取して乾燥後 AcOH 120 ml. と Me_2CO 120 ml. の混液に溶解し, EtOH 360 ml. を滴下してわずかに沈殿を生ぜしめ, 3.6 L. の EtOH 中に滴下する. 析出物を濾取し, Et_2O 1.6 L. を加えて攪拌下 3 hr. 還流し, 濾取し乾燥して IV 38 g. を得. $[\alpha]_D^{25} + 127.0^\circ$ ($c=1.622$, CHCl_3). $(\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}_7)_x$ Anal. Calcd.: C, 48.77; H, 5.74. Found: C, 48.46; H, 5.98.

IV の CrO_3 - KMnO_4 酸化による酸化物 (V) の合成 IV 5 g. を特級 AcOH 100 ml. に溶解し, 一方特級 CrO_3 1.35 g. を水 1 ml., AcOH 50 ml. に溶解した溶液を一度に加え, よく混和して水冷下一夜放置する. 反応液に MeOH 10 ml. を加えて 30 min. 室温放置後, 減圧で溶媒を留去し, 残渣に N HCl 50 ml. を加えると中間生成物が析出する. 水をとりにかえてよく粉末とし, 水をすてて生成物を AcOH 40 ml. に溶解し, 減圧下溶媒を留去し残渣を Et_2O 中に滴下すると, わずかに Cr^{+3} の青色をもった粉末 4.8 g. が得られる. これを AcOH 100 ml. に溶解し, KMnO_4 8.2 g. を少量ずつ加え, 室温で 3 日間攪拌後, 反応液を減圧濃縮し, N HCl 100 ml. および CHCl_3 100 ml. を加えて振盪し, 15% NaHSO_3 溶液を少量ずつ加えて Mn^{+4} を還元脱色し, 水層をさらに CHCl_3 100 ml. で抽出して合し, CHCl_3 溶液を水洗後 MgSO_4 で乾燥し, 減圧濃縮して残渣に Et_2O を加えると V が析出する. 収量 3.6 g. $[\alpha]_D^{25} + 144.7^\circ$ ($c=4.975$, CHCl_3).

V 中の $-\text{CO}_2\text{H}$ の滴定 V 約 100 mg. を精秤し Me_2CO 10 ml. に溶解して水 4 ml. を加え, 冰冷下 0.01N NaOH で滴定. 指示薬 phenolphthalein. 試料 a mg. 滴定値 b ml. とし, $-\text{CO}_2\text{H}$ がすべて glucuronic acid 残基によるものとすれば

$$\frac{260 \times b}{a \times 100} = \text{glucuronic acid residue (mole/mole)}$$

V より α (1, 4) 多糖類 VIII の合成 V 3 g. を CHCl_3 30 ml. に溶解し, CH_2N_2 の Et_2O 溶液を滴下して液性を中性とし, 減圧下溶媒を留去し残渣に EtOH を加えると V の methyl ester (VI) が粉末として得られる. 収量 3.1 g.; $[\alpha]_D^{25} + 150.9^\circ$ ($c=4.75$, CHCl_3). VI 2 g. を CHCl_3 40 ml. に溶解し 0.56N NaOMe 3 ml. を加えて振盪し水冷下一夜攪拌すると VII が析出する. Amberlite IR-120 (H) 3 ml. および水 20 ml. を加えて VII を溶解し, 水層を分取し約 10 ml. まで減圧濃縮したのち 0.25N $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 溶液 40 ml. を加えて 1 hr. 室温放置すると VIII の Ba 塩が析出する. これに Amberlite IR-120 (H) 10 ml. を加えて攪拌して Ba 塩を溶解し, さらに同 resin 10 ml. のカラムを通し, resin を水 40 ml. で洗浄後洗液と通液を合して減圧濃縮し, 残渣に EtOH を加えると VIII が析出する. 収量 1.1 g. $[\alpha]_D^{25} + 167.9^\circ$ ($c=1.918$, H_2O) アルカリ滴定法によって約 50% の glucuronic acid 残基を含む.

VIII の粘度測定 glyccoll の約 4% 水溶液を調製し, pH メーターを使用して pH 9 になるまで dil. NaOH を加え, その後 glyccoll 溶液が 2% 濃度になるように水を加える. VIII の結晶約 250 mg. を精秤して上記緩衝液 25 ml. に溶解し, その約 1% 濃度溶液を緩衝液で順次倍量に希釈して約 0.5, 0.25% 濃度溶液をつくり, 1.5 ml. を正確に分取して Ostwald 粘度計で 20° 恒温槽内で流下速度を測定. この流下時間を t , 緩衝液による盲検を t_0 とすれば比粘度 $\eta_{sp} = (t - t_0)/t_0$ また, 濃度を基礎構造単位当たりの平均 mole 濃度であらわしたものを c とすると, 還元粘度 (reduced viscosity) $= \eta_{sp}/c$ さらに極限粘度 (intrinsic viscosity) $= \lim_{c \rightarrow 0} \eta_{sp}/c$ である.

VIII の還元力の測定 Somogyi-Schaffer 法⁵⁾ に準ずる. Na_2CO_3 25 g., NaHCO_3 20 g., ロッセル塩 25 g., $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 7.5 g. を水に溶解し J_2 として 0.1N の KJO_3 溶液 100 ml. を加えて全量を 1 L. にする. この試薬 5 ml. をとり, glucose 0.2~1.0 mg. に匹敵する還元力をもった化合物の水溶液 5 ml. を加えてよく混和し, 煮沸水浴中で 15 min. 加熱し, 直ちに冷却し, N H_2SO_4 8 ml. を加えて酸性とし遊離する J_2 を 0.01N $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 液で滴定する. 別に盲試験を実施する.

本研究に際し, 終始御懇篤なる御指導を賜りました東京大学薬学部 石館守三名教授, 田村善蔵教授, 多くの御助言を賜りました弊社 林 茂常務取締役, 今井祐次工場次長に厚くお礼を申し上げます. また実験の一部に協力された浮間工場 梅本賢次, 助川満男, 山本錦二, 松永 功の諸君ならびに元素分析, 吸収スペクトルの労をとられた総合研究所分析室の諸氏に感謝いたします.