アミノ糖およびその関連化合物の分析化学的研究 (第2報¹⁾) *p*-Nitrobenzene-
diazonium 塩とコンドロイチン硫酸との反応機構について²⁾

小川俊太郎, 守田 実, 中島朱美, 吉田昭義

ロート製薬株式会社研究所³⁾

Analytical Studies on Amino Sugars and Their Related Compounds. II.¹⁾
On the Reaction Mechanism of Chondroitin Sulfate
with *p*-Nitrobenzenediazonium Salt²⁾

SHUNTARO OGAWA, MINORU MORITA, AKEMI NAKAJIMA,
and AKIYOSHI YOSHIDA

Research Laboratories, Rohto Pharmaceutical Co., Ltd.³⁾

(Received November 9, 1967)

The mechanism of the coloration reaction of chondroitin sulfuric acid with *p*-nitrobenzenediazonium salt was examined and the formation of 1,3-bis(*p*-nitrophenyl)triazene (I) as the principle of coloration was confirmed. It was assumed that formation of I involved rearrangement accompanying the reaction of the diazonium salt with the amino group in galactosamine, the component amino sugar in chondroitin sulfuric acid. Since this reaction with free galactosamine results in the formation of 2,5-anhydro-*D*-talose, the reaction mechanism depicted in Chart 4 was presumed.

前報で著者等は, *p*-nitrobenzenediazonium fluoroborate (以下 PNBD と略す) を用いるコンドロイチン硫酸の比色定量法を報告した。今回その反応機構を検討し若干の知見を得た。すなわちコンドロイチン硫酸 A を 1.5*N* HCl で 100°, 1 時間加水分解し, これに PNBD の水溶液を加えて冷却, 攪拌下に pH 6.5 付近まで中和すると, mp 230° の水に難溶性の黄色物質 (I) が析出する。I の赤外吸収 (IR) スペクトル (Fig. 1) は, IR cm⁻¹ (KBr): ν_{NH} 3290; δ_{NO_2} 1520, 1325; $\nu_{\text{N=N}}$ 1600; $\delta_{\text{=CH}}$ 850, 860 の吸収があり, またその元素分析値は C₁₂H₉O₄N₅ に一致し 1,3-bis(*p*-nitrophenyl)triazene と推定されたので, 別途パラニトロアニリンと PNBD とより得た標品と IR スペクトルの比較, および混融試験により I が 1,3-bis(*p*-nitrophenyl)triazene であることを同定した。

I はまた他の酸性ムコ多糖体, たとえばケラトポリ硫酸, ヒアルロン酸, ヘパリンを同様に処理した場合もしくはグルコサミン, ガラクトサミンなどのアミノ糖に PNBD を反応させても生成する。I を少量水

に溶解し, 強アルカリ性とするとき 516 mμ に吸収極大を有する赤色を呈すること, また定量条件下で反応させた溶液と I との薄層クロマトグラフィー (以下 TLC と略す) は両者一致した *R_f* 値を与えることから, I が本呈色の本体であることは明白である。I はアルカリ性において I' のような aci-form となり赤色を呈するものと考ええる。本反応はジアゾニウム塩としてクロライドを用いても同様の結果を得る (Chart 1)。

ジアゾニウム塩とアミノ基との反応について Howard 等⁴⁾ は各種アミノ酸, 脂肪族アミンとベンゼンジアゾ

Fig. 1. Infrared Absorption Spectrum of the Reaction Product (KBr)

1) 第1報: 小川俊太郎, 守田 実, 中島朱美, 吉田昭義, 薬誌, 88, 866 (1968).

2) 日本薬学会第87年年会, 京都, 1967年4月。

3) Location: Tatsumi, Nishiajiro-cho, Ikuno-ku, Osaka.

Chart 1. Reaction of the Amino Sugars and their Related Compounds with PNBD

ニウム塩との反応を行ない，アラニン，フェニルアラニンなどの α -アミノ酸からジアゾアミノベンゼンの生成を報告している (Chart 2).

Chart 2

この際中間に N_2 ガスを発生してアニリンが生成し，これが過剰のベンゼンジアゾニウム塩と反応してジアゾアミノベンゼンを生成するとし，例としてフェニルアラニンの場合，その脱アミノ化した phenyl lactic acid を捕捉，確認してその反応機構をより明確なものとしている．著者等の反応においても反応時 N_2 ガスを発生する

Fig. 2. Relations between Time of Hydrolysis and Formation of Galactosamine

—x—: PNBD method
—o—: Elson-Morgan method

ことから，同様の機構によりパラニトロアニリンが生成し，これが存在する PNBD 試薬と反応して I を生ずるものとする．一方反応後の糖残基については，コンドロイチン硫酸 A について種々検討したが，その主たる反応生成物を単離確認するに至らなかった．これは 1.5N HCl, 100° 1 時間という加水分解条件により脱アセチル化，脱スルホン化のみならず，種々の解裂反応も同時に進行するためである．この加水分解時間と Elson-Morgan 法によるガラクトサミンの生成量，PNBD 試薬による定量値との関係を検討したところ，Fig. 2 のようにに 15 min ですでにガラクトサミンの生成をみており，加水分解時間の経過につれてガラクトサミンの生成量は増大している．これに反し，PNBD 試薬による定量値は 50 min から 120 min の間で一定値を示している (Fig. 2).

4) A.N. Howard, F. Wild, *Biochem. J.*, **65**, 651 (1957).

コサミン, ガラクトサミンにつき検討を行なった. これらはいずれも PNBD 試薬との反応時 N_2 ガスを発生することより脱アミノ化したと考えられる. 著者等は最初 Howard 等の反応から類推してグルコサミンからはグルコースが, ガラクトサミンからはガラクトースの生成を予想したが, グルコース, ガラクトースの生成はまったく認められなかった. ヘキソサミンの脱アミノ化反応については Fischer 等^{5,6)} がグルコサミンに亜硝酸を作用せしめて得た物質を Chitose と名づけたのを初めとし多くの研究がなされており, Schorigin および Makarowa-Semiljanskaja,⁷⁾ 正宗,⁸⁾ 秋谷, 大沢等⁹⁾ は D-グルコサミン塩酸塩 (II) に亜硝酸を作用させた場合, グルコサミンの C₂ 位においてワルデン反転を起し, 2,5-anhydro-D-mannose (chitose) (IV) が, また永岡,⁸⁾ Foster,¹⁰⁾ Defaye¹¹⁾ 等は, D-ガラクトサミン塩酸塩に亜硝酸を作用させた場合, 同じく C₂ 位において反転を起した 2,5-anhydro-D-talose (V) の生成することを積極的に証明している (Chart 3).

Chart 3

今回 D-ガラクトサミン塩酸塩もしくは D-グルコサミン塩酸塩と PNBD 試薬との反応の場合にも, この亜硝酸との反応の場合と同様に 2,5-anhydro-D-mannose (chitose) (IV), 2,5-anhydro-D-talose (V) が生成するのではないかと考え, 標品として秋谷, 大沢, Defaye 等の方法に準じて調製した 2,5-anhydro-D-mannose および 2,5-anhydro-D-talose を用い D-グルコサミン塩酸塩, D-ガラクトサミン塩酸塩に PNBD を反応させた液につ

TABLE I. Thin-layer Chromatographic Behavior of the Reaction Products and Other Sugars

Substnace	R _f values					
	A	B	C	D	E	F
Product from glucosamine-PNBD	0.76	0.40	0.54	0.60	0.25	0.80
Chitose	0.78	0.41	0.53	0.61	0.25	0.80
Product from galactosamine-PNBD	0.65	0.15	0.52	0.46	0.12	0.63
2,5-Anhydro-D-talose	0.64	0.15	0.53	0.46	0.12	0.61
Glucose	0.50	0.05	0.52	0.34	0.15	0.50
Galactose	0.47	0.05	0.51	0.38	0.13	0.56
2-Desoxyglucose	0.63	0.24	0.60	0.49	0.37	0.73
Fructose	0.38	0.04	0.45	0.36	0.18	0.54
Xylose	0.58	0.18	0.58	0.48	0.32	0.67
Rhamnose	0.67	0.35	0.56	0.48	0.44	0.72

silicagel G nach stahl (Merck), solvent: A, BuOH—acetone—H₂O (4:5:1); B, EtOAc—iso-PrOH—H₂O (65:23:12); C, BuOH—EtOH—H₂O (5:2:4); D, BuOH—HOAc—H₂O (50:15:35); E, EtOAc—pyridine—H₂O (10:3:2); F, BuOH—pyridine—HOAc—H₂O (10:6:1:3)

- 5) E. Fischer, F. Tiemann, *Ber.*, **27**, 138 (1894).
- 6) E. Fischer, Andreae, *Ber.*, **36**, 2587 (1903).
- 7) P. Schorigin, N.N. Nakarowa-Semiljanskaja, *Ber.*, **68**, 965 (1935).
- 8) Masamune, Nagaoka, *Tohoku J. Exptl. Med.*, **53**, 21 (1950).
- 9) 秋谷七郎, 大沢利昭, 薬誌, **74**, 1259 (1954).
- 10) A.B. Foster, *Chem. and Ind.*, 627 (1955).
- 11) J. Defaye, *Bull. Soc. Chim. France*, (5), 999 (1964).

Fig. 3. Gas Chromatograms of Trifluoroacetate of Chitose and the Reaction Product

I: trifluoroacetate of several sugars

II: trifluoroacetate of chitose

III: trifluoroacetate of the reaction product

1: solvent, 2, 5: rhamnose, 3: xylose, 4: arabinose

6: ribose, 7: galactose, 8: mannose, 9: chitose

10: glucose, 11: fructose, 12: 2-desoxyglucose,

13: D-glucosamine

Shimadzu Model GC-1B with a differential flame ionization detector, stainless steel column (4 mm×4.5 m) packed with 1.5% SE-30 on silanized chromosorb W (60–80 mesh), column temp. 90°, detect. temp. 180°, sample chamber temp. 130°, carrier gas N₂ 50 ml/min.

き 6 種の溶媒系にて TLC を行ない、さらに 2,5-anhydro-D-mannose についてはトリフルオロアセチル化し、ガスクロマトグラフィーを行なったところ、Table I, Fig. 3 に示すように D-グルコサミン塩酸塩からは 2,5-anhydro-D-mannose, D-ガラクトサミン塩酸塩からは 2,5-anhydro-D-talose の生成していることを確認した。このことから D-グルコサミン (II), D-ガラクトサミン (III) と PNBD との反応では、まず PNBD 試薬が II, III のアミノ基と結合し、プロトン移動したのち加水分解して、一方ではパラニトロアニリンが生じ、これが過剰に存在する PNBD 試薬とただちに反応して 1,3-bis(p-nitrophenyl)-triazene (I) を生成する。他方糖は脱窒素し、C₂ 位において Walden 反転を起して D-グルコサミンからは chitose (IV) が、D-ガラクトサミンからは 2,5-anhydro-D-talose (V) が生成すると推定される (Chart 4)。

D-グルコサミン、D-ガラクトサミンが PNBD 試薬との反応により、亜硝酸との反応の場合と同様、2,5-anhydro 糖を生成することは新知見として興味あるものである。

考 察

コンドロイチン硫酸 A を 1.5N HCl, 100°, 1 時間という比較的緩和な条件で加水分解を行なうと、予期したような脱アセチル、脱スルホン体のみならず、さらにその構成アミノ糖であるガラクトサミンなどを生じ、これらはいずれも PNBD との反応により (I) を生成する。一方脱アミノ化の結果生ずる糖成分については、Foster 等¹²⁾ が ψ -heparin (desulfated heparin) と亜硝酸との反応においてグルコサミド結合が解裂して還元糖が生成することを認めており、また松島等¹³⁾ も chitosan (desulfated chitin) と亜硝酸との反応において、脱アミノ化と同時に分子内転移がおこり、グルコサミド結合が切断されて chitose が生成することを報告していることから推測すると、本研究における塩酸による加水分解条件下で単に脱アセチル化、脱スルホン化のみが進行する場合には、Chart 5 に示すような機構によって VI の生成が予想されるが、実際には加水分解時にすでにガラクトサミンの生成もあるため画一的な反応による糖残基の状態を確認し得なかった。しかしながら少なくともコンドロイチン硫酸 A の構成アミノ糖であるガラクトサミンからは、2,5-anhydro-D-talose (V) が生成することを確認し得た。

実 験 の 部

コンドロイチン硫酸 A と PNBD との反応 コンドロイチン硫酸ナトリウム A 1 g を 1.5N HCl 100 ml に溶かし、沸騰水浴中 1 hr 加熱する。冷後 1N KOH にて pH 6 付近まで中和し、これに PNBD 3 g の水懸濁液を攪拌下に加える。析出した黄色から橙褐色沈殿を濾取、水洗、乾燥。収量 0.53 g。MeOH より再結晶。黄橙色針状晶 mp 230–231°。Anal. Calcd. C₁₂H₉O₄N₅: C, 50.17; H, 3.14; N, 24.39. Found: C, 50.28; H, 3.38; N, 24.20. IR_{max}^{KBr} cm⁻¹: 3290 (NH), 1520 (NO₂), 1325 (NO₂), 1600 (–N=N–)。本物質は別途 1,3-bis(p-nitrophenyl)triazene (I) の標品と混融し、融点の降下を認めず、かつ IR スペクトル (KBr), TLC (Silicagel G nach Stahl, 250 μ , R_f 0.75 (CHCl₃), 0.15 (C₆H₆–CHCl₃ (1:1))) は完全に一致した。

ケラトポリ硫酸と PNBD との反応 ケラトポリ硫酸ナトリウム 0.5 g を 1.5N HCl 50 ml に溶かし、沸騰

12) A.B. Foster, E.F. Martlew, M. Stacey, *Chem. and Ind.*, 825 (1953).

13) Y. Matshushima, N. Fujii, *Bull. Chem. Soc. Japan*, 30, 48 (1957).

水浴中 1 hr 加熱する。冷後これに PNBD 1.5 g の水懸濁液を加え、氷冷、攪拌下に 1N KOH にて pH 6.5 付近まで中和する。析出した橙色沈殿を濾取、水洗、乾燥。収量 0.24 g MeOH より再結晶。mp 230° 前記標品 (I) と混融し、融点の降下を認めず、IR スペクトルも一致した。

ヒアルロン酸と PNBD との反応 ヒアルロン酸カリウム 20 mg を 1.5N HCl 10 ml に溶かし、沸騰水浴中 1 hr 加熱する。これに PNBD 100 mg の水懸濁液を加え、氷冷、攪拌下に 1N KOH にて pH 6.5 付近まで中和する。析出した橙色沈殿を濾取、水洗、乾燥。収量 10 mg. MeOH より再結晶 mp 230—231°。前記標品 (I) と混融し、融点の降下を認めず、IR スペクトルも一致した。

ヘパリンと PNBD との反応 ヘパリンナトリウム 20 mg を 1.5N HCl 10 ml に溶かし、沸騰水浴中 1 hr 加熱する。冷後これに PNBD 100 mg の水懸濁液を加え、氷冷、攪拌下に 1N KOH にて pH 6.5 付近まで中和する。析出した橙色沈殿を濾取、水洗、乾燥。収量 8 mg. MeOH より再結晶。mp 230—231°。前記標品 (I) と混融し、融点降下を認めず、IR スペクトルも一致した。

グルコサミンと PNBD との反応 i) 1,3-Bis(*p*-nitrophenyl) triazene の単離 D-グルコサミン塩酸塩 1 g を水 150 ml に溶かし、これに PNBD 3 g の水懸濁液を加え、氷冷、攪拌下に 1N KOH にて pH 6—6.5 付近まで中和する。析出した黄橙色沈殿を濾取、水洗、乾燥。収量 1.28 g. MeOH より再結晶、mp 230°。前記標品 (I) と混融し、融点の降下を認めず、IR スペクトルも完全に一致した。1N KOH で中和していくかわりに 1M Na₂CO₃ を用いても同じ結果を得る。

ii) 反応残留糖の検討——D-グルコサミン塩酸塩 0.2 g をごく少量の水に溶かし、これに PNBD 0.5 g の水懸濁液を加え、氷冷、攪拌下に 1N KOH にて pH 6.0 付近まで中和する。析出した黄橙色沈殿を濾去。

さらに濾液に 1N KOH を加えて析出する沈殿を繰返し濾去する。濾液について Table I に示す TLC を行なう。また濾液は減圧下に濃縮乾固し、得られた黄色粉末 10 mg に無水トリフルオロ酢酸 2 ml を加え、2 hr 放置。ルオロアセートとしてガスクロマトグラフィーを行なう。TLC, ガスクロマトグラフィーの結果は、秋谷、大沢等⁸⁾の文献記載にしたがって調製した、2,5-anhydro-D-amnrose (chitose) と完全に一致した。

ガラクトサミンと PNBD との反応 i) 1,3-Bis(*p*-nitrophenyl) triazene の単離 D-ガラクトサミン塩酸塩 0.5 g を水 100 ml に溶かし、これに PNBD 1.5 g の水懸濁液を加え氷冷、攪拌下に 1N KOH にて pH 6.0 付近まで中和する。析出した黄橙色沈殿を濾取、水洗、乾燥。収量 0.6 g. MeOH より再結晶、mp 230—231°。前記標品 (I) と混融し、融点の降下を認めず、IR スペクトルも完全に一致した。

ii) 反応残留糖の検討——D-ガラクトサミン塩酸塩 0.2 g をごく少量の水に溶かし、これに PNBD 0.5 g の水懸濁液を加え、氷冷、攪拌下に 1N KOH にて pH 6.0 付近まで中和する。析出する沈殿を濾去。さらに濾液に 1N KOH を加えて析出する沈殿を繰返し濾去する。得られた濾液について Table I に示す TLC を行なう。TLC の結果は Defaye¹¹⁾ の記載にしたがって調製した 2,5-anhydro-D-talose と完全に一致した。

謝辞 終わりに臨み本研究の発表を許可されましたロート製薬株式会社社長、山田輝郎氏に謹謝する。