

Title	Lupinus luteus種子の多糖類(第1報) : 構成糖の確認と2, 3, 6-Trimethyl D-galactoseの調製
Sub Title	The polysaccharide from lupinus luteus seed. I. : Identification of sugar component and preparation of 2,3,6-trimethyl D-galactose.
Author	友田, 正司(Tomod, Masashi) 村山, 季美枝(Murayama, Kimie)
Publisher	共立薬科大学
Publication year	1965
Jtitle	共立薬科大学研究年報 (The annual report of the Kyoritsu College of Pharmacy). No.10 (1965.) ,p.1- 4
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	
Genre	Technical Report
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00062898-00000010-0001

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

Lupinus luteus 種子の多糖類 (第1報). 構成糖の
確認と 2, 3, 6-Trimethyl D-galactose の調製.*

友田正司, 村山季美枝

The polysaccharide from *Lupinus luteus* seed. I. Identification of sugar component and preparation of 2,3,6-trimethyl D-galactose.

Masashi TOMODA and Kimie MURAYAMA

Polysaccharides were extracted from the seeds of lupinus luteus and constituent sugars were examined. Of these sugars, 60% was D-galactose, and other sugars were L-arabinose, D-xylose, L-rhamnose, and D-galacturonic acid. A fraction rich in D-galactose was separated from the polysaccharide, and after methylation followed by hydrolysis, yielded 2,3,6-trimethyl D-galactose as a major product. Consequently, fundamental structure of the polysaccharide is a 1→4 bonded chain of D-galactose.

多糖類, 少糖類, グリコシドなどの構造を研究する場合にはメチル化が重要な手段であり, 標準物質として部分メチル化単糖類が不可欠な重要性をもつことは多言を要しない. D-Galactose は動植物界に見出される複合糖質の構成成分として広く存在し, ガラクトースメチルエーテルがその構造研究に必要となることが多いが, その中でも 1→4 結合の存在を証明する標品として必要度の高い 2,3,6-trimethyl D-galactose は合成法が報告されていない. この物質を天然物のメチル化後加水分解によつて得た例としては, ある種の *Penicillia* の多糖類^{1),2)}, 植物ゴム³⁾, の他に *Lupinus albus* 種子の多糖類⁴⁾がある.

本報ではわが国で入手できる材料として *Lupinus luteus* の種子を選び, 多糖類を抽出しメチル化後加水分解して沓紙クロマトグラフィーによる分離で 2,3,6-trimethyl D-galactose を得られたので報告し, またマメ科植物 *Lupinus* の成分中多糖類に関しては *Lupinus albus* の他に *Lupinus termis* について簡単に報告されている⁵⁾ のみなので, 多糖類の構成糖の種類, 量比などについて検討した結果も述べる.

種子は脱皮後塩化ナトリウム液と水酸化ナトリウム液で処理して除タンパクし, 希水酸化ナトリウム液で加熱抽出後塩化水素含有メタノールで沈殿させて多糖体を得た. この物質は加水分解後沓紙クロマトグラフィーにより, D-galactose, L-arabinose, D-xylose, L-rhamnose, および D-galacturonic acid を構成糖とすることが明らかになった. またこれらの糖はそれぞれ β -D-galactose pentaacetate, L-arabinose diphenylhydrazone, di-O-benzilidene D-xylose dimethylacetal, tetra-O-acetyl L-rhamnose diethyldithioacetal, および D-gal-

* 薬学雑誌 85巻, 501 (1965). に発表

1) W. N. Haworth, H. Raistrick, M. Stacey : Biochem. J., 29, 2668 (1935).

2) *Idem* : *Ibid.*, 31, 640 (1937).

3) J. J. Connell, R. M. Hainsworth, E. L. Hirst, J. K. N. Jones : J. Chem. Soc., 1696 (1950).

4) E. L. Hirst, J. K. N. Jones, W. O. Walder : J. Chem. Soc., 1225 (1947).

5) W. Tadros, M. Kamel : J. Chem. Soc., 4532 (1952).

actaric acid として証明した. 構成糖の定量結果は, D-galactose 60.3%, L-arabinose 22.4%, D-xylose 4.4%, L-rhamnose 2.1%, D-galacturonic acid 10.8% である. この多糖体を希シュウ酸で加熱処理後エタノール分画して, ガラクトースに富む部分を取りメチル化を行なった.

水酸化ナトリウムとジメチル硫酸による処理後, ジメチルホルムアミドとヨウ化メチルおよび酸化銀によるメチル化⁶⁾を繰返して完全メチル化し, ギ酸, ついで硫酸で加水分解後⁷⁾ 濾紙クロマトグラフィーにより 8 分画に分離した. これらのメチル化単糖類の約 2% 量を占める物質は, 2,3,6-trimethyl D-galactose の文献値⁷⁾ に R_G および比旋光度が一致し, これをブロム水で酸化して 2,3,6-trimethyl D-galactonolactone に誘導して確認した. これがメチル化単糖類中に占める量的比率から, 本多糖体の構造の主体をなすものは D-galactose の 1→4 結合連鎖であると考えられる.

実 験 の 部

多糖体の抽出: 種子 500 g を 3 日間水浸後, 皮を除去して細碎し, 10% NaCl 1.7 L を加え 1 夜放置後吸引濾過, 残留物をさらに 10% NaCl 1.7 L で半日攪拌して 3 回処理し, ついで 0.2% NaOH 1.8 L と 16 時間攪拌し吸引濾過する処理を 3 回行なつたのち, 残留物に 0.2% NaOH 1 L を加え, 沸騰水浴中で 3 時間加熱し吸引濾過. 濾液に CH₃OH 4 倍容を加えて析出物を吸引濾取し熱時減圧乾燥, この抽出操作をさらに 1 回行なつた. 収量は初回 16.4 g, 2 回目 8 g. 両者を合して温水 400 ml を加え 1 夜放置後, 少量の不溶物を遠心分離して除き, 0.02 N HCl 含有メタノール 2 倍容を加え析出物を吸引濾過し, エタノールで洗つたのち熱時減圧乾燥. 淡黄白色粉末 22.5 g. NaOH 中和水溶液の $[\alpha]_D^{20} = +55^\circ$, N および無機質を含まない.

加水分解による構成糖の分離: 多糖体 1 g に N-H₂SO₄ 20 ml を加え沸騰水浴中で 6 時間加熱し 1 夜放置後遠心分離, 上澄液を BaCO₃ で中和し吸引濾過, 水洗して濾液を減圧濃縮, 3 ml となし CH₃OH 6 ml を加えて吸引濾過し, 沈殿は Dowex 50 で処理してバリウムを除いたのちウロン酸定性の試料とした. 濾液は減圧濃縮して中性単糖類定性の試料とした.

濾紙クロマトグラフィー: 東洋濾紙 No. 51 を使用, 一端より 5 cm を原点として上昇法で 30 cm 展開, ベンジジン-酢酸試薬⁸⁾ で検出. 検出された構成単糖類名とそれらの R_f 値を Table I に示す. 展開溶媒は, 1. n-Butanol : pyridine : water (6 : 4 : 3), 2. n-Butanol : benzene : pyridine : water (5 : 1 : 3 : 3, 上層). 3. Phenol : water (5 : 1).

Table I. R_f Values of sugar components.

	solvent 1.	solvent 2.	solvent 3.
L-rhamnose	0.60	0.54	0.64
D-xylose	0.50	0.41	0.48
L-arabinose	0.44	0.34	0.56
D-galactose	0.36	0.24	0.44
D-galacturonic acid	0.15	0.06	0.20

構成単糖類誘導体の合成: 加水分解物の中性単糖類分画を東洋濾紙 No. 50 を用いて溶媒 1 による濾紙クロマトグラフィーを行ない, 各単糖類に相当する部分を切りとつて 50% CH₃OH で抽出, 各部の $[\alpha]_D^{20}$ (fi-nal, H₂O) は次の通り. galactose 部…… +79.4°, arabinose 部…… +101.5°, xylose 部…… +17.6°.

6) R. Kuhn, H. Trischmann, I. Löw : Angew. Chem., **67**, 32 (1955).

7) E. L. Hirst, L. Hough, J. K. N. Jones : J. Chem. Soc., 928 (1949).

8) J. S. D. Bacon, J. Edelman : Biochem. J., **48**, 114 (1951).

rhamnose 部……+8.0°.

これらの各部および前述のウロン酸性試料について次の誘導体合成を行なった。

D-Galactose: 検体 290 mg に酢酸ナトリウム 150 mg および無水酢酸 2.1 ml を加え、加熱後碎水中に注いで 207 mg の板状晶を分離、95% C₂H₅OH から再結晶、m.p. 141°, 別に合成した β-D-galactose pentaacetate と混融して融点降下せず。

L-Arabinose: 検体 100 mg を水 0.5 ml に溶かし、塩酸ジフェニルヒドラジン 100 mg を 80% C₂H₅OH 2.5 ml に溶かした液を加えて1夜放置、針状晶 26 mg を得、90% C₂H₅OH から再結晶、m.p. 203° (decomp.), 別に合成した L-arabinose diphenylhydrazone と混融して融点降下せず。

D-Xylose: 検体 30 mg に試薬 (CH₃OH : 2.5N HCl in CH₃OH : C₆H₅CHO=6 : 1 : 2) 0.6 ml を加えて溶かし、氷室中に6日間放置、針状晶析出、濾取し氷水で洗い 9 mg を得、CH₃OH から再結晶、m.p. 211°, 別に合成した di-O-benzylidene-D-xylose dimethyl acetal と混融して融点降下せず。

L-Rhamnose: 検体 20 mg に c. HCl 0.2 ml を加え冷時溶解し C₂H₅SH 0.2 ml を加えて1時間振り混ぜ、冷却下に c. NH₄OH で中和、減圧乾燥し、無水酢酸:ピリジン (2:1) 混液 1 ml 加え室温で1夜放置後、水 4 ml 中に注ぎこみ CHCl₃ 4 ml で2回抽出、抽出液を sat. NaHCO₃ で4回洗い、さらに水洗、Na₂SO₄ で乾燥後蒸発、シロップ状残留物に CH₃OH 0.4 ml を加えさらに水2倍容を加えて氷冷、稜柱状晶 18 mg を分離、m.p. 58°, 別に合成した tetra-O-acetyl-L-rhamnose diethyldithioacetal と混融して融点降下せず。

D-Galacturonic acid: 検体 70 mg に Br₂ sat. 水 1.4 ml を加え、50° で3時間加温後、送風してから減圧濃縮、濾過水洗して微細なプリズム晶 22 mg を得、m.p. 216° (decomp.), 別に合成した D-galactaric acid と混融して融点降下せず。

シュウ酸処理による分画: 多糖体 5 g に 0.01 N oxalic acid 160 ml を加え沸騰水浴中で5時間加熱、不溶物を濾別し、濾液を CaCO₃ で中和後遠心分離、上澄液を減圧濃縮して 120 ml となし、エタノールを加えて分画沈殿させた。収量は次の通り。

33% エタノール濃度での沈殿 (Frac. A)……0.58 g, 33~50% エタノール濃度での沈殿 (Frac. B)……2.95 g, 50% エタノール濃度の可溶部 (Frac. C) ……0.90 g.

各分画の構成糖定量値は Table II のようである。galactose はアントロン法⁹⁾で、pentose はオルシン法¹⁰⁾で、rhamnose はチオグリコール酸法¹¹⁾で、galacturonic acid はカルバゾール法¹²⁾でそれぞれ定量し、arabinose と xylose の個別定量は Table I-solvent 1 による濾紙クロマトグラフィーで分離後オルシン法によった。

Table II. Quantitative determination of sugar components (%)

	Polysaccharide	Frac. A	Frac. B	Frac. C
D-galactose	60.3	47.4	78.5	53.6
L-arabinose	22.4	11.0	6.8	40.0
D-xylose	4.4		2.3	
L-rhamnose	2.1	2.8	1.9	0
D-galacturonic acid	10.8	38.8	10.5	6.4

メチル化: Frac. B 2 g を 30% NaOH 20 ml に溶解、N₂ 気流中で攪拌しつつ 30% NaOH 40 ml および (CH₃)₂ SO₄ 20 ml を同時に3時間で加え、60° に加温してさらに 30% NaOH 30 ml および (CH₃)₂SO₄

9) R. Johanson: Anal. Chem., **26**, 1331 (1954).

10) M. Tomoda: Chem. Pharm. Bull., **11**, 809 (1963).

11) M. N. Gibbons: Analyst, **80**, 268 (1955).

12) Z. Dische: J. Biol. Chem., **167**, 189 (1947).

10 ml を同時に 1 時間で加え、室温に 1 夜放置後 5 N H₂SO₄ で中和、上層に分離する餡状部と、残液を濾過し減圧濃縮乾固して CH₃COCH₃ と CH₃OH 各 100 ml で抽出後溶媒をとばし HCON(CH₃)₂ 50 ml でさらに抽出後減圧濃縮したものを合し、減圧乾燥後、HCON(CH₃)₂ 27 ml に溶かし攪拌しつつ CH₃J 10 ml および新製 Ag₂O 8 g を徐々に加え、24 時間攪拌後吸引濾過して CHCl₃ 30 ml で 2 回洗い濾洗液を遠心分離上澄液を 1% KCN 50 ml と振りまぜ下層を分離し上層を CHCl₃ 20 ml で洗ってこれに合し Na₂SO₄ で乾燥後減圧濃縮乾固。得られたメチル化体は OCH₃, 28.84%, 収量 1.4 g. これを HCON(CH₃)₂ 10 ml および CHCl₃ 10 ml に溶かし、CH₃J 8 ml と Ag₂O 6 g を用いて同様にメチル化、OCH₃, 34.60% のものを得、さらに同様にメチル化したものは OCH₃, 36.94%, さらに 1 回メチル化して淡黄色粉末のメチル化体 1.2 g, OCH₃ 37.17% を得。

メチル化体の加水分解： 最終メチル化体 0.7 g に 90% HCOOH 28 ml を加え、沸騰水浴中 7 時間加熱後 N₂ を通じながら減圧濃縮乾固、これに N H₂SO₄ 10 ml を加え沸騰水浴中 3 時間加熱後 BaCO₃ で中和、吸引濾過し水と CH₃OH で洗い濾洗液を減圧濃縮乾固、少量の CH₃COC₂H₅ に溶かし不溶分を除き蒸発乾燥してシロップ状物 0.6 g を得。

メチル化単糖類の分離： 加水分解物 0.5 g を東洋濾紙 No. 50 (40×40 cm) 8 枚につけ、溶媒 4, *n*-butanol : ethanol : water : 1% ammonia (40 : 10 : 49 : 1, 上層) で上昇法により 30 cm 展開、ベンジジン-酢酸試薬で検出された 8 個のスポットに相当する部分を切りとりメタノールで抽出 (Table III, frac. 1~8), 最も高い R_G 値の部分 (frac. 1) は溶媒 5, Methyl ethyl ketone : Water (azeotrope) で 2 個のスポットに分離した。各部分の R_G 値と収量を Table III に示す。

Table III. R_G Values and yields of methylated sugars

	yield (mg)	solvent 4 (R _G)	solvent 5 (R _G)
frac. 1	7	0.98	1.02
			0.97
frac. 2	15	0.91	0.89
frac. 3	224	0.78	0.64
frac. 4	49	0.71	0.58
frac. 5	14	0.63	0.33
frac. 6	13	0.61	0.26
frac. 7	8	0.53	0.19
frac. 8	14	0.42	0.16

2,3,6-Trimethyl D-galactose の証明： Table III - frac. 3 は微黄色粘性をもつ液体, $[\alpha]_D^{20} = +79^\circ$ (H₂O), 溶媒 4 による R_G 値は 2,3,6-trimethyl D-galactose に相当。本品 32 mg を水 0.18 ml に溶かし, Br₂ 0.05 ml を加えて 55° に 3 時間半加熱, 40° 以下で減圧濃縮乾固し粗結晶 30 mg を得, エーテル : 石油エーテル混液で再結晶, 針状晶の 2,3,6-trimethyl galactonolactone を得。m.p. 98°, $[\alpha]_D^{20} = -40^\circ$ (H₂O), Anal. Calcd. for C₉H₁₆O₆: OCH₃, 42.3%, Found.: OCH₃, 42.2%.