

# キチン分解生成物の薄層クロマト グラフィーによる分離—I.\*

グルコサミン, *N*-アセチルグルコサミン  
およびキトオリゴ糖の分離

武田道夫・冨田輝雄・大村隆重・勝浦 洋\*\*

Thin-Layer Chromatography of Saccharides obtained by  
Degradation of Chitin—I.  
Separation of Glucosamine, *N*-Acetylglucosamine,  
and Chito-oligosaccharides

By

Michio TAKEDA, Teruo TOMIDA, Takashige ŌMURA, and Hiroshi KATSUURA

The technique of thin-layer chromatography has been applied to the separation of glucosamine, *N*-acetylglucosamine, and chito-oligosaccharides (oligosaccharides of 2-amino-2-deoxy-D-glucose) on silica-gel, aluminum oxide, and kieselguhr. The results obtained are shown in Figs. 1,2 and Tables 2,3.

Solvent mixture of butanol-methanol-ammonia, phenol-water-ammonia, pyridine-butanol-water, and *n*-propanol-water-ammonia were found to be suitable for the separation of glucosamine and *N*-acetylglucosamine on silica-gel.

Chito-oligosaccharides having as many as 5 glucosamine units may be fractionated effectively with solvent mixture of pyridine-butanol-water or *n*-propanol-water-ammonia on silica-gel. A plot of  $\log (R_f/1-R_f)$  against molecular size yielded a straight line with the  $R_f$  values of the chito-oligosaccharides obtained by thin-layer chromatography, and indicated the homologous nature of oligosaccharide series.

All attempts to replace silica-gel with aluminum oxide or kieselguhr have been unsuccessful, especially aluminum oxide probably inhibited ELSON-MORGAN's reaction for glucosamines.

---

\* 水産大学校研究業績 第440号, 1964年12月22日受理  
Contribution from the Shimonoseki University of Fisheries, No. 440  
Received Dec. 22, 1964

日本水産学会昭和39年度秋季大会において発表  
\*\* 福岡電子工業大学 電子材料工学科

## 1. 結 言

アミノ糖およびキチン分解酵素に関する研究には、グルコサミン、*N*-アセチルグルコサミンおよびこれらに関連したいろいろなオリゴ糖の分離確認を必要とし、このことに関しては既に BARKER 等<sup>1)</sup>および HOROWITZ 等<sup>2)</sup>が、カラムクロマトグラフィーとペーパークロマトグラフィーを組合わせて実施している。いずれの場合も多重展開を必要としているので、薄層クロマトグラフィーによる分離法の検討を試みた。

(なおキチン分解生成物の命名に関しては、BARKER 等<sup>1)</sup>による方法を参考として次のように定めた。すなわち 2-acetoamido-2-deoxy-D-glucose を *N*-アセチルグルコサミンとし、これの 1・4' 結合によって出来るオリゴ糖類をキチンオリゴ糖と名づける。又 2-amino-2-deoxy-D-glucose をグルコサミンとし、これの 1・4' 結合によって生ずるオリゴ糖をキトオリゴ糖と名づけた。)

## 2. 実験方法および試薬

### 2-1. 吸着剤

MERCK 製のシリカゲル (Kiesel gel-G), アルミナ (Aluminium oxid-G) およびケイソウ土 (Kieselgur-G) を用いた。

### 2-2. 発色剤

ELSON-MORGAN<sup>3)</sup>によるアセチルアセトンと *p*-ジメチルアミノベンツアルデヒド溶液による方法<sup>4) 5)</sup>, アニスアルデヒド・硫酸溶液<sup>6)</sup>, ニンヒドリン溶液<sup>7)</sup>および塩素・ヨウ素デンプン溶液<sup>8) 9)</sup>を使用した。

### 2-3. 展開剤

主としてメタノール, エタノール, *n*-プロパノール, イソプロパノール, *n*-ブタノール, ペンタノール-2, フェノール, およびピリジンの種々の組合わせを用いた。(この外にもジオキサン, アセトン, 酢酸エチル, 酢酸ブチル, ベンゼン, キシレン, トルエン, エーテル, *n*-ヘキサン, *n*-ペンタン, および酢酸等をマイクロ展開法により検討したが, いずれも不適當であった。)

### 2-4. キトオリゴ糖

BARKER 等<sup>1)</sup>, HOROWITZ 等<sup>2)</sup>および DISTLER 等<sup>10)</sup>の方法を参照して第1表(次頁)に示す方法で調製した。

### 2-5. 展開用プレートの洗滌

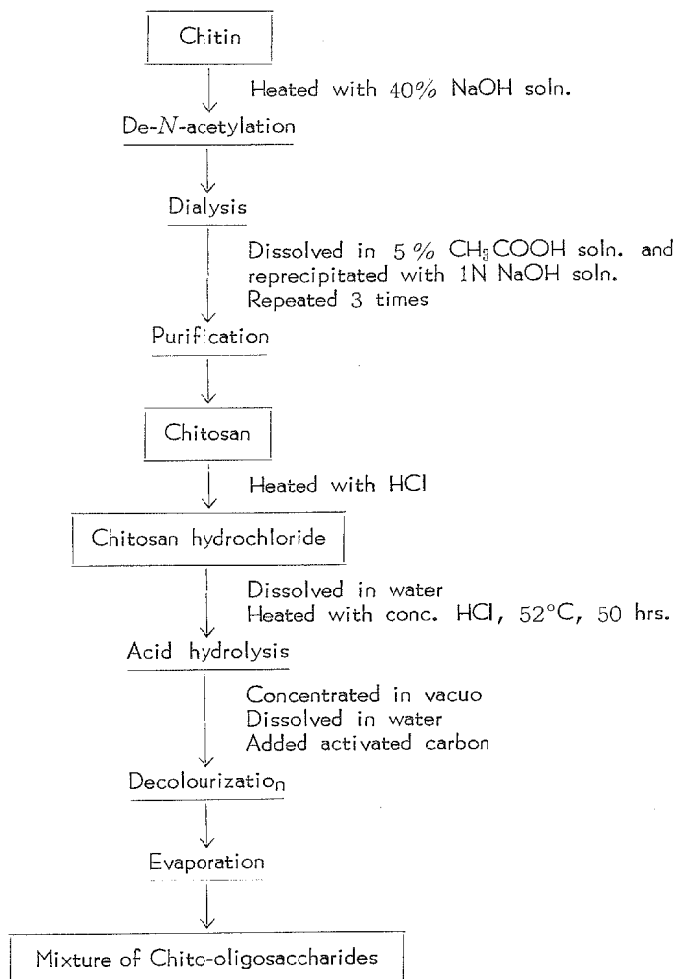
ガラス板上に作った吸着剤の薄層(プレート)は使用前にメタノール・エーテル混液で予備洗滌し, 発色を鮮明にするようにした。

## 3. 実験結果および考察

### 3-1. グルコサミンおよび *N*-アセチルグルコサミンの分離

遊離のアミノ基を有するキトオリゴ糖と, そのアミノ基がアセチル化されたキチンオリゴ糖の分離に関する基礎的な知見を得るために, グルコサミンと *N*-アセチルグルコサミン両単糖類のみの分離を試みた結

Table 1. Preparation of Chito-oligosaccharides.



果を第2表(次頁)に示した。表中の  $\Delta R_f$  はグルコサミンと *N*-アセチルグルコサミンの  $R_f$  の差で、分離効果の判定の資料とした。

使用した条件下では、すべての場合 *N*-アセチルグルコサミンの  $R_f$  が、グルコサミンのそれより大であり、分子量よりも極性の方が吸着剤に対して強く影響するものと考えられる。

同一展開溶媒に対しては、アルミナを吸着剤とした場合の方が、シリカゲルを使用するより  $R_f$  は大となり、スポットもまとまる傾向があるが、 $\Delta R_f$  は小となっている。

又アルミナの場合は検出法として ELSON-MORGAN 法が無効で、アニスアルデヒド・硫酸溶液を使用しなければならなかったが、この場合はバックグラウンドがピンク色に着色するため、スポットの検出がやや困難であり、特に複写による記録保存には不向きであった。

展開溶媒に酢酸を添加する時は  $R_f$  は大となるが、テーリングが大きくスポットの判定が難しくなった。(第2表の試料番号1および9)。メタノール・ブタノール系展開溶媒では、メタノールの割合が大となると、それぞれの  $R_f$  および  $\Delta R_f$  も大となるが、テーリングも大きく、50:50が適当であった(第1図)(5頁)。

フェノール水溶液は分離も良く、スポットもまとまるが、展開時間および溶媒の乾燥に時間を要し、展開距離の延長および繰返し展開も  $\Delta R_f$  の上ではそれ程有効とはならなかった。又アニスアルデヒド・硫酸溶液による発色では、バックグラウンドも発色するためスポットの検出が困難である。ニンヒドリンによる発

Table 2. Separation of glucosamine and *N*-acetylglucosamine by thin-layer chromatography.

Absorbent	Developer	Colour reagent	Developing time (min)	Length of run (cm)	$R_f$		$\Delta R_f^{*2}$	Suitable concentration and extent of spot
					<i>N</i> -Acetyl-glucos-amine	Glucos-amine		
1 Si-gel	BuOH-AcOH-W (77:6:17)	DMAB *3	—	10	(1)	0.17	—	12γ, 4mm φ
2 Alumina	Benzene-BuOH-Py-W (1:5:3:3)	AA *4	—	"	0.24	0.05	0.19	12γ, 2mm φ
3 "	PhOH-W-Amm (74:27:1)*1	"	180	"	0.69	0.55	0.14	6γ, 3mm φ
4 "	" (70:30:2)*1	"	180	"	0.60	0.46	0.14	12γ, 3mm φ
5 "	MeOH-BuOH-Amm (50:50:1)	"	40	"	0.31	0.14	0.17	" , 3mm φ
6 Si-gel	" (30:70:1)	DMAB	40	"	0.23	0.08	0.15	" , tail formed
7 "	" (50:50:1)	"	40	"	0.36	0.16	0.20	" , "
8 "	" (70:30:1)	"	50	"	0.49	0.26	0.23	" , "
9 "	MeOH-BuOH-AcOH (50:50:1)	"	60	"	0.58	0.30	0.28	" , "
10 "	PhOH-W-Amm (74:26:1)*1	"	180	"	0.38	0.28	0.10	" , 4mm φ
11 "	" "	"	—	15	0.45	0.27	0.18	" , "
12 "	PhOH-W (74:26)*1	"	180	10	0.38	0.16	0.22	" , 3mm φ
13 "	PhOH-W-Amm (74:26:1)*1	"	—	15×2	0.32	0.20	0.12	"
14 "	Py-BuOH-W (5:3:2)	AA	150	12×2	0.33	0.25	0.08	"
15 "	nPrOH-W-Amm (70:30:1)	"	—	12×2	0.26	0.19	0.07	"

Abbreviation for solvents: AcOH=acetic acid, Amm=ammonia water, BuOH=*n*-butanol, MeOH=methanol, PhOH=phenol, nPrOH=*n*-propanol, Py=pyridine, W=water

\*1 Parts by weight

\*2 Differences in  $R_f$  values between *N*-acetylglucosamine and glucosamine

\*3 *p*-Dimethylaminobenzaldehyde and acetylacetone

\*4 Anisaldehyde and sulfuric acid

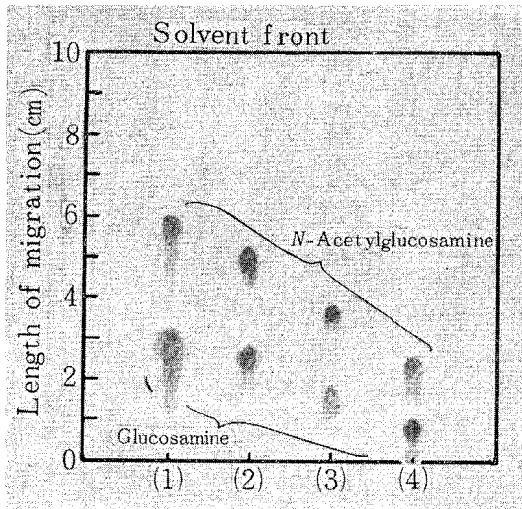


Fig. 1. Variation of sharpness of separation of glucosamine and *N*-acetylglucosamine with component of solvent in methanol-butanol system.

Component of solvents :

	Methanol	Butanol	
(1)	50%	50%	(Acetic acid 1%)
(2)	70"	30"	(Ammonia water 1%)
(3)	50"	50"	( " " )
(4)	30"	70"	( " " )

Absorbent : silica-gel, colour reagent : acetylacetone and *p*-dimethylaminobenzaldehyde

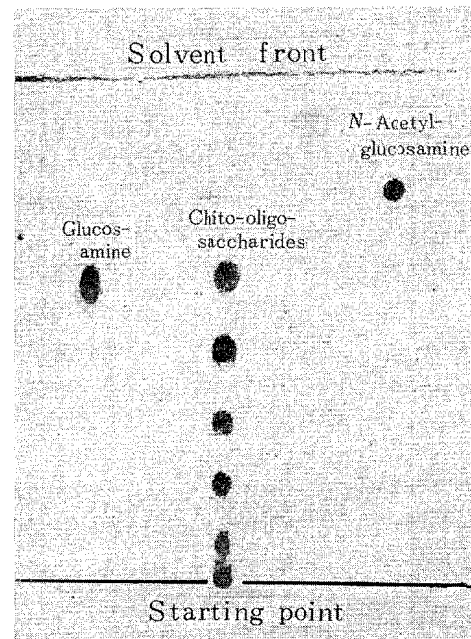


Fig. 2. Fractionation of chito-oligosaccharides with butanol-pyridine-water mixtures on silica-gel.

Length of run : 12cm × 2 times, colour reagent : anisaldehyde and sulfuric acid

色法は遊離のアミノ基を有するグルコサミンのみが発色するので、分別判定には有効である。

### 3-2. キトオリゴ糖の分離

第3表(次頁)および第2図に示すように、ブタノール・ピリジン・水系の展開溶媒(2回展開)によって始めてキトオリゴ糖が6つのスポットとして検出された。*n*-プロパノール・水・アンモニア水(70:30:1)溶媒も良好であったが、やや  $R_f$  が小さくスポットの分離が不明瞭であった。

FRENCH 等<sup>11)</sup> および山内等<sup>12) 13)</sup> はマルトース系オリゴ糖のペーパークロマトグラフィーによる分離の結果について、その重合度の小さい間は、重合度と  $\log(R_f/1-R_f)$  との間に直線関係が成立し、同じ溶媒系ではこの直線の傾斜はその構成単糖単位の結合様式に関係していることを見出している。

ペーパークロマトグラフィーが分配能の相異によって分離するのと違って、薄層クロマトグラフィーは、吸着能を主とする分離と考えられているので、FRENCH 等の考えをそのまま適用することは出来ないかも知れないが、キトオリゴ糖についての  $R_f$  値を同じように処理した結果を第3図(7頁)に示した。すなわち重合度の小さい処では重合度と  $\log(R_f/1-R_f)$  との間に直線関係が成立するので、得られた6つのスポットはそれぞれグルコサミンを単糖単位とする重合度1から5迄の同属列に相当するものと考えて良いのではないと思う。なお重合度の大きい、すなわち  $R_f$  の小さい部分は、繰返し展開を行なう際、展開溶媒によって吸着層が荒らされるので、その影響のために直線から外れて来るような  $R_f$  値が得られるのではないと思う。

又発色法として、塩素化を行なった後デンプン・ヨウ素カリウム溶液を噴霧して、ヨウ素を遊離させる方

Table 3. Fractionation of chito-oligosaccharides with thin-layer chromatography.  
Absorbent: silica-gel, colour reagent: anisaldehyde and sulfuric acid

	Developer	Length of run (cm)	$R_f^*$		Fractionation of chito- oligosaccharides
			<i>N</i> -Acetyl- glucosamine	Glucosamine	
1	MeOH- nPrOH- W (1:1:1)	15	0.70	(0.43)	
2	MeOH- nPrOH- Amm (50:50:1)	15×2	0.20	(0.07)	
3	MeOH- iPrOH- Amm (50:50:1)	//	0.28	(0.14)	
4	MeOH- BuOH- Amm (50:50:1)	12×2	0.33	(0.19)	(3 fractions)
5	MeOH- PeOH- Amm (50:50:1)	15×3	(0.20)	(0.10)	
6	EtOH- PeOH- Amm (50:50:1)	10×2	(0.17)	(0.07)	
7	nPrOH- Py- Amm (50:50:1)	15×2	0.41	( )	
8	nPrOH- W- Amm (70:30:1)	12×2	0.31	0.23	6 spots
9	nPrOH- BuOH- Amm (50:50:1)	//	(0.10)	( )	
10	PrOH	15	0.13	0.06	
11	PrOH- BuOH (1:1)	//	0.39	(0.20)	
12	PrOH- Py- Amm (50:50:1)	15×2	0.42	( )	
13	iPrOH- Py- W (1:1:1)	15	0.90	(0.73)	
14	BuOH- Py- W (5:3:2)	12×2	0.41	0.34	6 spots**
15	BuOH- Py- W (3:1:1)	12×2	0.38	0.23	(3 fractions)
16	PeOH- Py- W (1:1:1)	15	0.75	(0.60)	
17	PhOH- W (3:1)	//	0.43	0.21	(3 fractions)

Abbreviation for solvents: Amm=ammonia water, BuOH=*n*-butanol, EtOH=ethanol, PhOH=phenol, PeOH=pentanol-2, nPrOH=*n*-propanol, iPrOH=iso-propanol, Py=pyridine, W=water

\* Parenthesized term indicate tail formed.

\*\* See Fig. 2

法は、各オリゴ糖の同重量に対しては、その重合度の如何にかかわらず同じ濃度の発色をするという結果が、ペーパークロマトグラフィーにおいて得られているので、薄層クロマトグラフィーに就いて実施したが、塩素化が十分行なわれないようでスポットの検出が困難であった。

WEILL および HANKE<sup>14)</sup>は吸着剤にケイソウ土を用いてマルトース系オリゴ糖を一回の展開で分離することに成功しているの、キトオリゴ糖についても試みたが、未だ適当な溶媒を見出し得ないで、実験を継続中である。

### 3-3. アルミナの*N*-アセチルグルコサミンにおよぼす影響

先にアルミナを吸着剤として用いる時、ELSON-MORGAN 法による検出が無効であることを述べたが、この原因について検討を試みた。

*N*-アセチルグルコサミン溶媒に、220°C で2時間以上活性化したアルミナ粉末を加え、温浴上で加熱した後、その上澄液と洗浄水を減圧下で濃縮した液をシリカゲルプレート上で展開し、無処理の*N*-アセチルグルコサミンのスポットと比較した。アルミナ処理の試料はアニスアルデヒド・硫酸溶液を噴霧しただけで、加熱しなくとも鋭敏に発色し、 $R_f$  値のやや大きい別のスポットに分かれた。これが何に相当するものであるかは未だ明らかにしていないが、蒸留水のみをアルミナで同じように処理した液はなんらスポットが検出されなかった点を考えると、明らかに*N*-アセチルグルコサミンから、アルミナによって生成さ

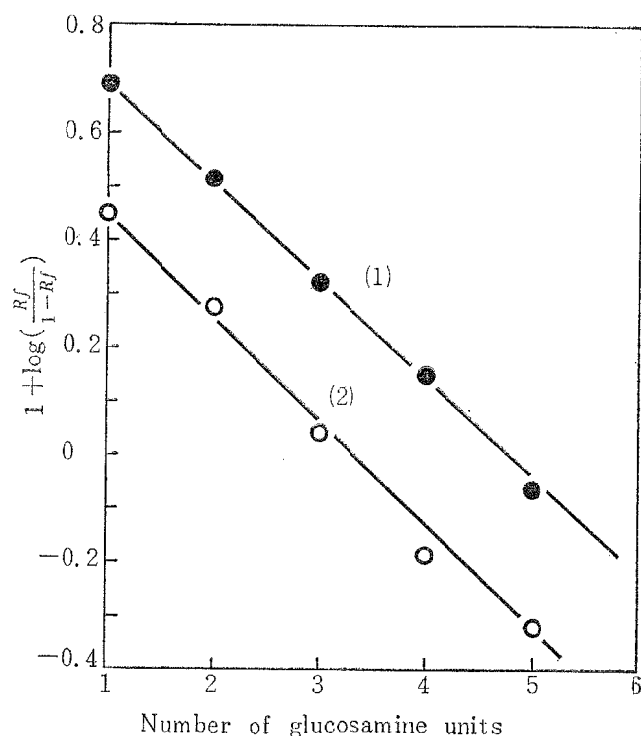


Fig. 3. Relation between  $\log(R_f/1-R_f)$  and number of glucosamine units in thin-layer chromatographic separation of chito-oligosaccharides on silica-gel.

(1) With butanol-pyridine-water (5 : 3 : 2); (2) with *n*-propanol-water-ammonia (70 : 30 : 1)

れたものである。

別に光電比色計によって、アルミナ処理による *N*-アセチルグルコサミン溶液の吸光度の変化を検討した。その結果、或る時間迄処理時間によって、吸光度は明らかに低下して来るが、一定値に達した後は平衡を保つことがわかった。この吸光度の低下が、単にアルミナの吸着によるものであるか、または化学変化を伴ったものであるかについては、更に検討中である。

又アルミナプレートを温浴上にさらして、活性度を低下せしめたものについては、ELSON-MORGAN 反応を僅かに示したので、アルミナがアセチルアセトンによるアセチル化を阻害することが、*N*-アセチルグルコサミンの脱アセチル化、または異性化の反応と共に起っていることも考えられる。

いずれにしても、薄層クロマトグラフィーでは試料の相対濃度が高く、吸着剤の接触表面積も大きいので、カラムクロマトグラフィーでは見られなかった新しい吸着剤の影響が現われて来ることが考えられるので、十分注意しなければならない点であろう。

(なおキチンオリゴ糖については、BARKER 等<sup>1)</sup>の方法によって調製し分離を試みたが、いまだに良い結果を得られていないので、更に実験を継続中である。)

## 4. 結 言

グルコサミン, *N*-アセチルグルコサミンおよびキトオリゴ糖の薄層クロマトグラフィーによる分離を試みて次の結果を得た。

1. 吸着剤としてはシリカゲルが適当であった。アルミナを用いる時は、アルミナによる種々の阻害反応が伴われるものと考えられる。
2. 展開溶媒としてはブタノール・メタノール・アンモニア系、ブタノール・ピリジン・水系および *n*-プロパノール・アンモニア・水系のものが良い結果を示した。特にキトオリゴ糖の分離にブタノール・ピリジン・水系を用いて6つのスポットが得られた。
3. キトオリゴ糖の分離より得られたスポットの  $R_f$  値から計算した  $\log(R_f/1-R_f)$  を、重合度1から5迄に対応させると、ほぼ直線関係が得られたので、各スポットはグルコサミンを単糖単位とするオリゴ糖に相当するものと考えた。

キチンオリゴ糖の分離およびケイソウ土を吸着剤として一回の展開で分離する方法については更に検討中である。

試料の調製に使用したカニ殻を供せられた宝幸水産株式会社 前富和彦氏、北洋水産株式会社 手塚久雄氏に厚くお礼申し上げます。

## 文 献

- 1) BARKER, S. A., A. B. FOSTER, M. STACEY and J. M. WEBER, 1958 : *J. Chem. Soc.*, 2218.
- 2) HOROWITZ, S. T., S. ROSEMAN and J. BLUMENTHAL, 1957 : *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 5046.
- 3) ELSON, L. A. and W. T. J. MORGAN, 1933 : *Biochem. J.*, **27**, 1827.
- 4) REISSIG, J. L., J. L. STROMINGER and L. F. LELAIR, 1955 : *J. Biol. Chem.*, **217**, 959.
- 5) 泉 邦彦, 1959 : 蛋白質 核酸 酵素, **5**, 43.
- 6) STAHL, S. and U. KALTENBACH, 1961 : *J. Chromatog.*, **5**, 351.
- 7) MOFFAT, E. D. and R. I. LYTLE, 1959 : *Anal. Chem.*, **31**, 926.
- 8) RYDON, H. N. and P. W. G. SMITH, 1952 : *Nature*, **169**, 922.
- 9) FOWNING, R. F. and H. IRZYKIEWICZ, 1963 : *Nature*, **200**, 1128.
- 10) DISTLER, J. J. and S. ROSEMAN, 1962 : "Methods in Carbohydrate Chemistry", **2**, Academic Press, New York, p. 305.
- 11) FRENCH, D. and G. M. WILD, 1953 : *J. Am. Chem. Soc.*, **75**, 2612.
- 12) 麻生 清・山内文男, 1955 : 醸酵工学, **33**, 195.
- 13) 山内文男・松田和雄, 1964 : 化学の領域, **18**, 689.
- 14) WEILL, C. E. and P. HANKE, 1962 : *Anal. Chem.*, **34**, 1736.