

カラメルの研究 第2報

シヨ糖の熱分解による少糖類の生成

北岡正三郎*・鈴木喜六*

Shozaburo KITAOKA and Kiroku SUZUKI

Caramels and Caramelization. Part 2. Formation of Oligosaccharides in the Pyrolysis of Sucrose

はじめに

シヨ糖を加熱熔融すると、いわゆるカラメルと呼ばれる褐色の物質になるが、このものの化学的本態については古くから研究があり、TRUHAUTら⁽¹⁾の総説に詳述してある。1858年、GELIS⁽²⁾はシヨ糖カラメルの中に三種のシヨ糖脱水物が存在すると報告した。すなわちカラメラン、カラメレン、カラメリンである。この研究は以後のカラメル研究の足がかりとなり、STOLLE⁽³⁾、CUNNINGHAM and DORÉE⁽⁴⁾はさらに詳細な研究を行ない、とくにカラメランはシヨ糖のカラメル化における第一次生成物と考えられたので詳しく記載された。これらの結果を総括すると、カラメランは190°前後でシヨ糖を乾熱し、84%エタノールで抽出してえられる無定形物質で、その組成はシヨ糖1分子より水2分子が脱水したものである。このものの性質、誘導体、反応性についても詳しく報告されている。

しかしカラメルの化学的本態に関する研究はその後少なく⁽⁵⁾、とくに近代的な分析技術を用いた報告は極めてまれであって、HODGE⁽⁶⁾は糖類の褐変反応の総説の中でカラメルの近代的研究が余りにも少ないことにおどろいている。そして糖類のカラメル化反応については、その機構が全くわかっていないのが現状である。糖類の関与する褐変反応の中で最も代表的なものと考えられる、いわゆるアミノカルボニル反応ではアミノ酸を含む1-アミノ-1-デオキシフラクトースが初期中間生成物であることが見だされてから、その機構解明に長足の進歩が見られたが、カラメル化反応についてはそのような手がかりは何も見だされていない。この点に कांगがみ、われわれはさきに従来シヨ糖のカラメル化において初期生成物であり、単一な物質と考えられていたカラ

メランが、多数の糖脱水物および縮合物の混合物にすぎないことを示した⁽⁷⁾。

本研究はカラメランを調製する条件でシヨ糖を加熱熔融し、84%エタノールで抽出したものについて組成の一部を明らかにしたものであって、シヨ糖がカラメル化に当ってグルコースとフラクトースに分解し、またはtransglycosylationによって、それぞれの脱水生成物、縮合生成物を与えることを示し、若干のグルコ二糖類の固定に成功したので報告するものである。

実験方法

1) シヨ糖カラメルの調製

CUNNINGHAM, DORÉE⁽⁴⁾がカラメラン調製に用いた方法によってシヨ糖を加熱熔融した。すなわち、シヨ糖を乾燥後開放したナス形フラスコに入れ、190±5°の油浴中で加熱した。内容物はガラス棒でかく拌し、内容物の重量が12%減少する点で加熱を止めた。内容物は褐色のシラップとなり、これを5倍量の84%エタノールで加熱抽出した。冷後濾過し、濾液を濃縮して固形物に至らした。褐色の吸湿性のある粉末である。このものを試料カラメルとした。このものより所謂カラメランを調製するには、水に溶解した上酵母処理により酸酵性糖を除き、酵母を濾別し濃縮して粉末化すればよい。

2) シヨ糖カラメルの分画

100gのシヨ糖よりえられた上記カラメルの10%水溶液を活性炭—セライト(1:1, W/W)のカラム⁽⁸⁾(10×55cm)に吸着させ、水、2.5%エタノール、5.0%エタノールで順次溶出した。溶出液は2—3ℓのフラクションとし、各フラクションは濃縮後ペーパークロマトグラフィ、薄層クロマトグラフィによって溶存する物質を検出し、同様のスポットを与えるフラクションは合

* 島根大学農学部 食品化学研究室

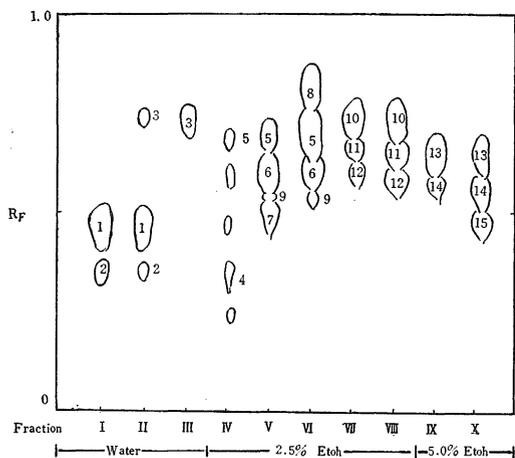


Fig. 1

Thin-layer chromatogram of Fractions (0—5% ethanol eluates) of the 84% ethanol extract of sucrose caramel

Solvent system : n-butanol-pyridine-water (5:3:2)

Spray reagent : naphthoresorcinol-sulfuric acid

し、第1図に示すようにI—Xの10個の分画をえた。クロマトグラフィによって何らスポットがえられなくなると溶出液のエタノール濃度を上記のように変えて溶出をつづけた。本研究はさらに7.5%および10.0%エタノールにより溶出を続行しているが、本報告では5.0%エタノール溶出までの結果について記載する。

3) ペーパー・クロマトグラフィ

一次元上昇法により、必要に応じて二重あるいは三重展開を行なった。展開溶媒は次の通りである。

- (a) n-プロパノール-酢酸エチル-水 (7:1:2, v/v/v)
- (b) n-ブタノール-ピリジン-水 (3:1:1, v/v/v)
- (c) 水飽和フェノール
発色剤は次の通りである。
- (a) アンモニア性硝酸銀 (0.1N AgNO₃ と5Nアンモニア水を等量混合したもの)
- (b) ベンジジン試薬 (ベンジジン0.5g, トリクロロ酢酸10gを90mlのn-ブタノールと10mlの水に溶かしたもの)
- (c) 過ヨウ素酸-過マンガン酸カリ試薬⁽⁹⁾

4) 薄層クロマトグラフィ

薄層は Silicalayer G (半井化学製) 1gに対し、2 ml²の割合で0.1N ホウ酸を加えよくかく拌後0.25 mmの厚さにつくった。これを110°に30分間乾燥したものを使用した。展開剤は次のものを用いた。

- (a) n-ブタノール-ピリジン-水 (5:3:2)
- (b) n-ブタノール-酢酸-水 (5:1:4)

また発色剤はつぎの通りである。

- (a) アンモニア性硝酸銀
- (b) ナフトレゾルシノール-硫酸 (0.2%のナフトレゾルシノール-エタノール溶液と20%硫酸の等量混合物)
- (c) アンスロン-リン酸試薬⁽¹⁰⁾

4) アセチル化

ショ糖カaramelを分画後五酸化リチウム上でよく乾かし、冷ピリジン中で無水酢酸と反応させアセチル化を行なった⁽¹¹⁾。アセチル化物で結晶にえられたものは再結晶の上、物理恒数を測定した。融点は島津微量融点測定器によって測定し、補正はしていない。

実験結果

カラメルは前に報告した⁽⁷⁾のように、沪紙および薄層クロマトグラフィで単一のスポットを与えず、帯状になって相互に分離確認できないほど多数のスポットが密接して検出される。本実験で用いたショ糖カaramelについても全く同様であった。5-ヒドロキシメチルフルフラールのスポットはカラメルの場合と同様に確認された。

試料カaramelの水溶液を前述の方法によって活性炭-セライトを用いるカラム・クロマトグラフィによって分画し、フラクションを整理統合したものの薄層クロマトグラムが第1図である。溶出を水および2.5%と5.0%エタノールで行なった結果だけをここに示している。ここに示した分画の収量合計は試料カaramelの約30%にあたり、残部は7.5%および10.0%エタノールおよびさらに高濃度アルコール溶出分画中と不溶出部にある。

第1図に示したように、これら分画中に15の物質の存在が確認される。そのおのおの物質の同定を試みた。同定は主として沪紙および薄層クロマトグラフィにより、アセチル化物による同定もあわせ行なった。

スポット No. 1: このものは硝酸銀還元性でケトース反応 (アンスロン-リン酸試薬) 陰性であり、第2図に示すように沪紙クロマトグラム上標品のグルコースと同一のR_Fを与え、グルコースと同定された。また分画Iをアセチル化したものから結晶がえられ、このものの物理恒数は第1表に示すようにα-D-グルコース・ペンタ

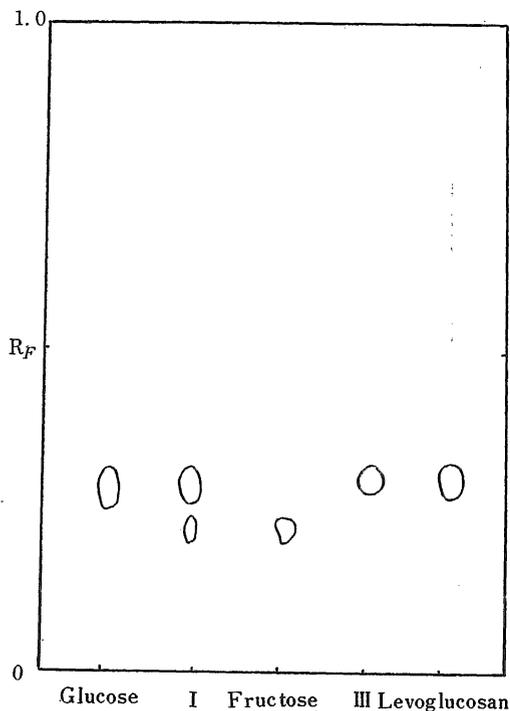


Fig. 2

Paper chromatogram of Fractions I and III

Solvent system :

n-propanol-ethyl acetate-water (7:1:2)

Spray reagent :

ammoniacal silver nitrate; NaIO_4 - KMnO_4

Table 1

	Spot No. 1	α -Glucose Pentaacetate
M.p., °C	108-112	112-113
$[\alpha]_D$ (CHCl_3) $^\circ$	+100	+103

アセテートの物理恒数⁽¹¹⁾と一致し、赤外吸収曲線も一致したのでこの同定を支持するデータとなった。このアセチル化物をメタノール性ナトリウムで脱アセチル化したものは勿論 No. 1 と同じ R_f のスポットを与える。

スポット No. 2 : このものは硝酸銀還元性でケトース反応陽性であり、滷紙クロマトグラフィでフラクトースと同一の R_f を与えた (第2図)。このことから、この物質はフラクトースと同定された。

スポット No. 3 : このものは硝酸銀反応陰性で、過ヨウ素酸一過マンガン酸カリ反応陽性であった。第2図に示すように滷紙クロマトグラフィでレボグルコースと

同一の R_f を与え、レボグルコースと同定された。このものをアセチル化すると融点 105-108° の結晶を与え、このものはレボグルコース・トリアセテート (融点 108-109°)⁽¹²⁾ と混融して融点の降下を示さなかった。また赤外スペクトルでも両者は全く同一の吸収を示した。

スポット No. 4 : ナフトレゾルシノール-硫酸反応は陽性であるが、アンスロン-リン酸試薬およびアンモニア性硝酸銀試薬には陰性で、還元糖ではないと考えられるが、収量が少なく、これ以上の同定実験が行なえなかった。分画 IV はこの他多くの収量の少ないスポットがえられたが、スポット No. 5 以外はすべて非還元性で同定されなかった。

スポット No. 5 : 硝酸銀を還元し、ケトース反応陰性である。分画 VI はアセチル化したものから結晶性アセチル化物がえられ、その脱アセチル化物の滷紙および薄層クロマトグラムから、このものがスポット No. 5 の物質より誘導されたことがわかった。このアセチル化合物は第2表に示す物理恒数を示し、標準品の β -イソマルトース・オクタアセテートの物理恒数⁽¹³⁾と一致した。両者は混融して融点の降下を示さず、また赤外スペクトルでも完全に一致した。このことからスポット No. 5 はイソマルトースであると結論される。

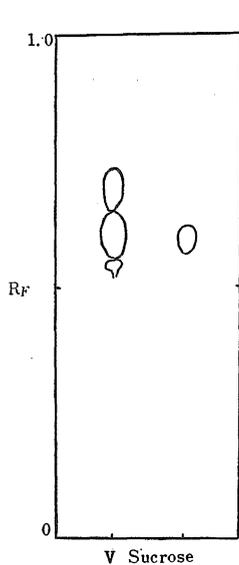
Table 2

	Spot No. 5	β -Isomaltose Octaacetate
M.p., °C	142-145	146-147
$[\alpha]_D$ (CHCl_3) $^\circ$	+98	+96.9

スポット No. 6 : このものは通常の硝酸銀試薬非還元性であるが、さらに強いアンモニア性硝酸銀⁽¹⁴⁾ (5% AgNO_3 に濃アンモニア水を滴下し、一旦生じた沈でんを溶解させたもの) 溶液には陽性の反応を示し、またケトース反応も陽性であった。薄層クロマトグラム上シュクロース標準品とすべての溶媒系で同一の R_f を示した (第3図)。このことから、このものは未分解のシュクロース (ショ糖) と結論される。

スポット No. 7 : 硝酸銀試薬に対しては通常および高濃度の条件で陰性であり、アンスロン-リン酸試薬には陽性であった。このことから、この物質はフラクトースの脱水生成物であると想像されるが、標準品をもたなかったため、これ以上の同定はできなかった。

スポット No. 8 : ナフトレゾルシノール-硫酸試薬にのみ陽性で、他の呈色試薬にはすべて陰性であった。このものの構造は現在の段階ではわかっていない。



V Sucrose

Fig. 3

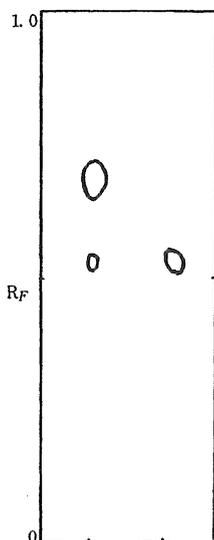
Thin-layer chromatogram of Fraction V

Solvent system :

n-butanol-pyridine-water
(5:3:2)

Spray reagent :

5% AgNO₃-conc. NH₄OH



VI Kojibiose

Fig. 4

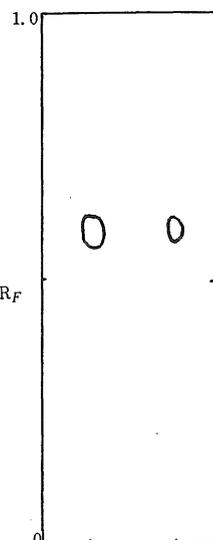
Thin-layer chromatogram of Fraction VI

Solvent system :

n-butanol-pyridine-water
(5:3:2)

Spray reagent :

ammoniacal silver nitrate



VII Nigerose

Fig. 5

Paper chromatogram of Fraction VII

Solvent system :

n-propanol-ethyl acetate
-water (7:1:2)

Spray reagent :

ammoniacal silver nitrate

スポット No. 9 : 硝酸銀還元性でケトース反応陰性であった。このものを含む分画VIを濾紙および薄層クロマトグラフィで標準品のコージビオースと比較したところ、同一の R_F を与えた (第4図)。このことから、スポット No. 9 はコージビオースと同定された。

スポット No. 10 : ナフトレゾルシノーラー硫酸試薬には陽性で、他の試薬には陰性であった。このものの同定には成功していない。

スポット No. 11 : ケトース反応陽性で硝酸銀は高濃度の条件でも還元しない。この結果からスポット No. 7 と同様にフラクトースの脱水生成物と推定される。

スポット No. 12 : 硝酸銀還元性で、ケトース反応陰性である。分画 VII を標準品のニゲロースと濾紙および薄層クロマトグラム上比較して、用いたすべての溶媒系で同一の R_F 値を示した。この物質はよってニゲロースと同定された。(第5図)

スポット No. 13 および No. 14 : 分画IXを濃縮してえたシラップ1gをとり、水溶液とし、活性炭—セライトカラムによる再クロマトグラフィを行ない、両者の分別を試みた。カラムは5.0×50cmで溶出は2.5%から10.0%までのエタノールを用いる gradient elution⁽¹⁵⁾ によった。全溶出液3ℓで両者を完全に分離することができ

た。

両フラクションをそれぞれ濃縮乾固したのちアセチル化して、それぞれ結晶性のアセチル化物をえた。両アセチル化物の物理恒数を第3表に示す。

Table 3

	Spot No.13	Spot No.14
M.p., °C	118-119	165-166.5
[α] _D (CHCl ₃) ₂₀	+19	+52

両アセチル化物を脱アセチル化し、0.1 N の硫酸で100° 1時間加水分解したものについて薄層クロマトグラフィでしらべたところ、両物質ともグルコースのスポットのほか未知のスポットがそれぞれえられた。フラクトース、レボグルコーザンはこの加水分解物に存在しない。このようなデータから、スポット No. 13 および14の物質はグルコースと他の構造未知の脱水生成物が縮合したものであると推定される。

スポット No. 15 : 還元糖に対する試薬にはすべて陰性で、ナフトレゾルシノーラー硫酸試薬にのみ陽性であ

った。このものの構造もわかっていない。

考 察

実験結果からわかるように、カラメルをつくる条件で調製したショ糖カラメルは多数の物質を含む複雑な混合物である。これらのうちグルコースとフラクトースが存在することはショ糖の一部が熱分解中に加水分解することを示している。この両者の見掛けの量をくらべてフラクトースが少ないのはケトースの方がより速やかに二次分解を行なうことを示すものと考えられる。

比較的明瞭に分離出来た15個の物質のうちで、グルコースとフラクトースおよび未反応のショ糖以外に同定したものはレボグルコーザンとイソマルトース、コージビオースおよびニゲロースの3種のグルコ二糖類であった。レボグルコーザンは1, 6-アナンヒドロ-β-グルコースであって、グルコースより水1分子の脱水によって生成する。ショ糖が熱分解時に先ずグルコースとフルクトースに加水分解し、ついで前者が脱水してレボグルコーザンを生成するのか、あるいはショ糖の開裂によって直ちにグルコース部分がこの無水物に変化するのかわからない。次に同定した3種のグルコ二糖類はすべてα-結合を有するものであることは極めて興味深い。この実験で取扱ったカラメルの分別(5.0%エタノール画分まで)では予想しうるグルコ二糖類の大部分が溶出されるはずであるが、クロマトグラム上の呈色反応の結果から上記3種以外にグルコ二糖類と推定されるスポットはえられなかった。杉沢ら⁽¹⁶⁾はグルコースを150°に加熱してえたカラメルから多種類のグルコ二糖類を同定しており、これらはα-結合のものもβ-結合のものも含んでいる。この点から、本実験でα-結合を有するグルコ二糖類のみが見出されたことは、ショ糖が加水分解して生成したグルコースから二次的脱水縮合によってこれら二糖類ができたのではなく、ショ糖中のα-グルコース部分がtransglycosylationによって遊離グルコースと結合した可能性が考えられる。しかしアミロースを乾熱してえられるピロデキストリン中にはゲンチオビオース、ソホロースの存在が知られている⁽¹⁷⁾ので、この推定が正しいと断定することはできない。ただ一旦遊離したグルコースからα-結合の二糖類だけが選択的に生成すると考えるのは困難である。

ケトースの呈色をする物質は比較的少数しかえられていない。予想されるジアンヒドロジフラクトースを含めてケトース関係の標品化合物がなかったため、これら物質の同定は現段階では行なえなかった。

以上のほかに非還元性に見なされる若干の物質がクロマトグラム上に検出されている。これらはレボグルコー

ザンまたはその他のグルコースの無水物(たとえばジアンヒドログルコース⁽¹⁸⁾)、フラクトースの非還元性無水物のほか、スポット No.13, 14で明らかになったような非還元性無水物と糖グルコースよりなる二糖類無水物がかなり生成していることを示している。このようなタイプの化合物はレボグルコーザンの熱重合反応によって生成することが知られている⁽¹⁹⁾。

以上要約すると、ショ糖を190±5°に加熱してえたカラメルを84%エタノールで抽出したものから、クロマトグラフィによる分別によって未分解のショ糖、加水分解産物のグルコース、フラクトース、脱水生成物のレボグルコーザンのほか、イソマルトース、コージビオース、ニゲロースの3種のα-グルコ二糖類を同定した。この他ケトース誘導体と考えられる物質2種と、非還元性物質若干の存在を明らかにした。この後者には糖無水物とグルコースよりなる二糖類無水物が含まれる。

引 用 文 献

1. TRUHAUT, R., VITTE, G. et LASSALLE-SAINT-JEAN, V., Bull. Soc. Pharm. Bordeaux 101: 97, 1962
2. GELIS, A.: Ann. Chim. Phys. 52: 352, 1858
3. STOLLE, F.: Z. Pflanzl. Nahrungsmittelchem. 49: 800, 1899
4. CUNNINGHAM, M. and DORÉ, C.: J. Chem. Soc. 1917: 587
5. VON ELBE, G.: J. Am. Chem. Soc. 58: 600, 1936
6. HODGE, J. E.: J. Ag. Food Chem. 1: 928, 1953
7. KITAOKA, S. and SUZUKI, K.: Agr. Biol. Chem. 31, in press.
8. WHISTLER, R. L. and DURSO, D. F.: J. Am. Chem. Soc. 72: 677, 1950
9. LEMIEUX, R. U. and BAUER, H. F.: Anal. Chem. 26: 920, 1953
10. 岡田正志・杉井道夫: 薄層クロマトグラフィ, 第1集(化学の領域臨時増刊), 南江堂, 東京, p.130, 1964
11. WOLFROM, M. L. and THOMPSON, A.: Methods in Carbohydrate Chemistry, Vol. II (WHISTLER, R. L. and WOLFROM, M. L., eds.), Academic Press, New York, p. 212, 1963
12. COLEMAN, G. H.: Methods in Carbohydrate Chemistry, Vol. II (WHISTLER, R. L. and WOLFROM, M. L., eds.), Academic Press, New York, p. 399, 1963
13. WOLFROM, M. L., GEORGES, L. W. and MILLER I. L.: J. Am. Chem. Soc. 71: 125, 1949

14. HOUGH, L. : *Nature* 165 : 400, 1950
15. 成田耕造・村上孝夫 : クロマトグラフィの実際 I, 広川書店, 東京, P.28, 1964
16. SUGISAWA, H. and EDO, H. : *Chem. and Ind.* 1964 : 892; *J. Food Sci.* 31 : 561, 1966
17. THOMPSON, A. and WOLFROM, M. L. : *J. Am. Chem. Soc.* 80 : 6618, 1958
18. HEYNS, K., STUTE, R. and PAULSEN, H. : *Carbohydrate Research* 2 : 132, 1966
19. WOLFROM, M. L., THOMPSON, A., WARD, R. B., HORTON, D. and MOORE, R. H. : *J. Org. Chem.* 26 : 4617, 1961

Summary

Sucrose was pyrolyzed in the open air at $190 \pm 5^\circ$ to 12% weight loss and the residue extracted with 84% hot ethanol. The caramel obtained by concentrating this extract was submitted to carbon-Celite column chromatography and the fractions of 0—5.0% ethanol eluates analyzed for the constituents by means of paper and thin-layer chromatographies. Glucose and fructose were found to be present, the fact indicating that a part of sucrose was hydrolyzed during the pyrolysis. Levoglucosan and the three α -gluco-disaccharides of isomaltose, kojibiose and nigerose were identified by chromatographies and conversion into the acetates. Color reactions revealed presence of a few ketose-containing substances, beside undecomposed sucrose, and a number of unreducing substances, some of which were proved to be anhydro-disaccharides made of glucose and an anhydrosugar.