

3.1. 一般操作

3.1.1. ガラス細工

化学の実験を行うにあたってガラス細工はしばしば必要になる。市販されているものも多いが、実際に使う試薬量やガラス器具の大きさに合わせて、自分で適当なサイズのスポイトなどを作っておけば便利である。以下にバーナー使用上の注意、攪拌棒やスポイト、キャピラリーの作り方を記す。

3.1.1.1. バーナー使用上の注意

周囲で引火性の溶媒などを使っていないことを確認した上で、火をつけること。ふいごで強制的に空気を送り込むタイプのは、通常のテクルバーナーよりも高温の炎をつくれる。ただし本実験においては、テクルバーナーを用いる。空気量調節ネジを使い、空気を十分に入れて火力を最大限にして用いること。

3.1.1.2. 攪拌棒および目皿押さえ棒の作り方

ガラス棒を20～30 cmに切る。このときガラス棒に平ヤスリを斜めにあてて前に押し出すようにして傷をつけ、傷口を前方にしてやや引っぱり気味に折るとよい。両端をバーナーで赤くなるまで熱して肉をためながら丸める。先端付近(3～5 cm)をあたためて少し曲げておくと便利である(図 1A)。同様に、十分に熱した後、引き延ばしたり、端を熱して玉を作りスレート板に軽く押し付けることによって、図 1B のような目皿押さえ棒なども作成できる。

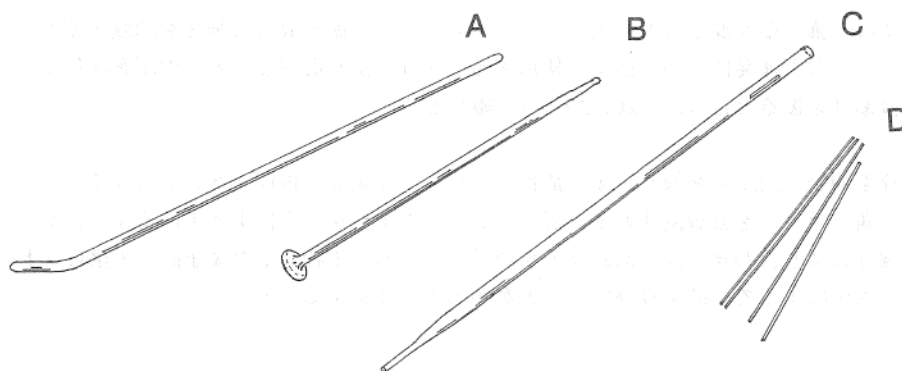


図 1 ガラス細工で作るもの
A: 攪拌棒, B: 目皿押さえ棒, C: スポイト, D: キャピラリー

3.1.1.3. スポイトの作り方

約40 cmの長さのガラス管(外径9 mm あるいは7 mm)の両端を指先で軽く持ち、中心部をゆっくり炎に近づける。少しずつ炎を強くし、ガラス管をゆっくり回転させながら、中心部が真っ赤になりやわらかくなるまで均等に熱する。この時わずかに中心部の方向に力を加えておき、加熱部分のガラス壁を厚くする。炎から離してゆっくり両端を引っ張る。スポイトの先端になる部分が適当な長ささと太さになったところで引っ張るのを止める。放冷後、適当な箇所でもガラス管を切断する。スポイトの両端を軽く熱してなめしておく。これで一度に2本のス

ポイントが作れるが、工夫次第で短いガラス管でもスポイトを作ることができるので、ガラス管を無駄にしないこと。
失敗した場合は、廃棄せずにキャピラリーの作成に利用すること。

3.1.1.4. キャピラリー（細管）の作り方

ガラス管の加熱の方法はスポイトと同様である。熱した後、炎から離して少し速くガラス管を引っ張ると、加熱部分が長く伸びて細管ができる。これを約 10 cm の長さに切って、薄層クロマトグラフィー用のキャピラリーにする(図 1D)。切断面が不規則に欠けたものは、薄層上に溶液をスポットしにくいので、できるだけ丁寧に切ること。キャピラリーも一人当たり少なくとも 15 本作成すること。

3.1.2. 分液漏斗による分配抽出

分液漏斗は、試料を二つの互いに混じり合わない溶媒のあいだで分配するために用いる。異なる分配係数を有する物質は上層と下層の溶媒に異なる濃度で溶けるため、理論的には分液漏斗による分配操作の繰返しだけでも分離することができる。本実験では主に、水溶液中の有機化合物を有機溶媒で抽出する場合、あるいは有機溶媒中の酸、塩基性物質を水で抽出する場合などに分液漏斗を用いる。抽出に用いる有機溶媒は、ヘキサン、トルエン、酢酸エチルなど水と混じり合わないものを使用する。分配後、通常は上層が有機層であるが、塩化メチレンやクロロホルムなどのように、比重が水よりも重いものは下層が有機層になる。下記の方法は、水溶液に含まれている疎水性の物質を有機溶媒で分配抽出する場合のものである。

方法

- ① 分液漏斗をスタンドのリングに立て、活栓を少量の水で濡らしてから活栓を閉めた後、適当量の水を入れ、活栓から液漏れがないことを確認する。
- ② 分液漏斗に試料を含む水溶液を入れ、これと等量ないし 6 割程度の有機溶媒を入れる。全液量が分液漏斗の容量の 2/3 以上にならないように注意する。
- ③ 上の玉栓の小穴が分液漏斗のスリ合わせの溝とずれていることを確認した後、右手の手のひらに栓を当てて分液漏斗を逆さまにする。直ちに上の活栓を左手であけ、内圧を開放する。活栓を閉めた後、図 2 のように持ち、ゆっくりと弧を描くように振り混ぜる。試料によっては、強く振り混ぜると乳化することがあるので、振り混ぜる強さを加減すること。エーテルなど揮発性の高い溶媒を使用するときは、振り混ぜるごとに内圧を開放する。分液漏斗を振るときは、実験台から少し離れること。
- ④ 再び活栓を開いて内圧を開放した後、活栓をしっかりと閉じて再びスタンドに立てる。この時、三角フラスコを分液漏斗の下に置くこと。上の玉栓を真上に引き上げるようにして開け、漏斗のスリ合わせの溝にあわせて再び差し入れる。玉栓をしたまま回して溝にあわせると、内圧によって溶液が飛び出ることがあるので注意すること。

- ⑤ 二層が完全に分離するまでしばらく放置した後、下の活栓を開いて静かに下層を三角フラスコに流し出す。上層との界面が活栓のすぐ上まで来たところで一度活栓を閉め、漏斗をゆっくりと傾けるようにして回すと、内壁に付着していた下層の液体が下にたまってくる。再び下の活栓を開け、界面がちょうど活栓の穴の中心に来たところで活栓を閉める。

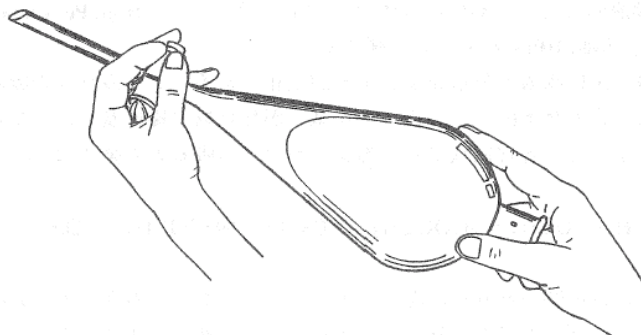


図 2 分液漏斗の持ち方

- ⑥ 分液漏斗の脚部に付着している下層の溶液をなるべく三角フラスコに受けてから上の玉栓を抜き、分液漏斗の上部口から別の三角フラスコに上層の液体を移し入れる。
- ⑦ 水層を再び分液漏斗に入れ、有機溶媒を加えて再度分配操作を繰り返す。目的物質の回収率を高めるため最低 3 回の分配操作を行なうことが多い。
- ⑧ 操作終了後、分液漏斗を洗浄しよく乾燥させて、スリ合わせ部分に紙片をはさんで保管する。紙片をはさんでおかなければ、活栓が取れなくなることがある。

3.1.3. 薄層クロマトグラフィー

クロマトグラフィーは、固定された物質(固定相)と移動する物質(移動相)の間におかれた化合物の物理化学的挙動の違いを利用して成分分離を行う方法であり、分離原理によって主に、吸着、分配、イオン交換、分子ふるいの 4 種類に分類される。また、移動相の種類によって液体クロマトグラフィーとガスクロマトグラフィーに、固定相を保持する方法によって薄層クロマトグラフィー、カラムクロマトグラフィーなどに分類される。

薄層クロマトグラフィー(thin layer chromatography, 略語 TLC)は液体クロマトグラフィーの一種であり、固定相としてシリカゲルなどをガラスプレートやアルミプレートの表面に薄くコーティングし、毛管現象を利用して溶媒を下から上へ展開する方法である。本法は有機化合物の最も簡便な分離分析法のひとつとして多用されている。なおカラムクロマトグラフィーは、固定相をガラス管などに充填し、重力やポンプなどを利用して移動相を流す方法であり(項目 3.7.3.②参照)、高速液体クロマトグラフィー(high-performance liquid chromatography, 略語 HPLC)もその一種である。

シリカゲルは、主に吸着を分離原理とする固定相である。シリカゲルの吸着力は、粒子表面のケイ素原子に結合した水酸基(シラノール基)が化合物の極性基との間で水素結合を形成することによって生じる。各官能基に対するシリカゲルの吸着力の強さは、

-Cl < -H < -OCH₃ < -COOCH₃ < -C=O < -NHCOCH₃ < -OH < -COOH

の順序である。化合物間の官能基の違いによってシリカゲルへの吸着力が異なるため、溶媒で展開した場合シリカゲル上での移動速度に差が生じ、分離が達成される。一方、各溶媒の溶出力の強さは、

ヘキサン < トルエン < クロロホルム < エチルエーテル < 酢酸エチル < アセトン
< メタノール < 水 < ピリジン < 酢酸

の順序である。溶出力は主に、化合物とシリカゲルとのあいだの水素結合を、溶媒みずからの水素結合で置換する強さである。溶出力を調整するため、通常これらの溶媒を混合して用いることが多い。酸性試料の場合、展開溶媒に 1～5% の酢酸あるいはギ酸を加えることによって解離を抑え、スポットが尾を引く(テーリングする)のを防ぐ。

本実験で薄層クロマトグラフィーに使用する TLC プレートは、Merck 社製の Kieselgel 60 F254(ゲル厚 0.23 mm)である。これは、アルミプレートに平均直径 60 μm のシリカゲル粒子をコーティングしたものであり、蛍光指示薬として、254 nm の波長の光で励起されて緑色の蛍光を発するマンガン活性化ケイ酸亜鉛を含有している。紫外(UV)吸収をもつ化合物のスポットは蛍光を発しないので、紫外線ランプのもとでは黒く見える。

方法

- ① TLC プレートをハサミで適当な大きさに切る。この時、シリカゲルがはがれないように注意深く丁寧に切る。シリカゲルがはがれると溶媒の展開面が不揃いになり、分離が悪くなる。
5 cm x 10 cm の大きさで、4～5 試料(4～5 列)を展開することができる。
- ② 切り出したプレートの下端から 1 cm のところに鉛筆で軽く線を引き、0.7～1 cm の間隔で線上に印をつける。
- ③ 試料溶液をキャピラリーにとり、シリカゲルを傷つけないように注意しながら、マークしたところだけで小さくスポットする。このとき、スポット部分に息を吹きかけて溶媒を乾かしながら行なうと、スポットが広がらない。

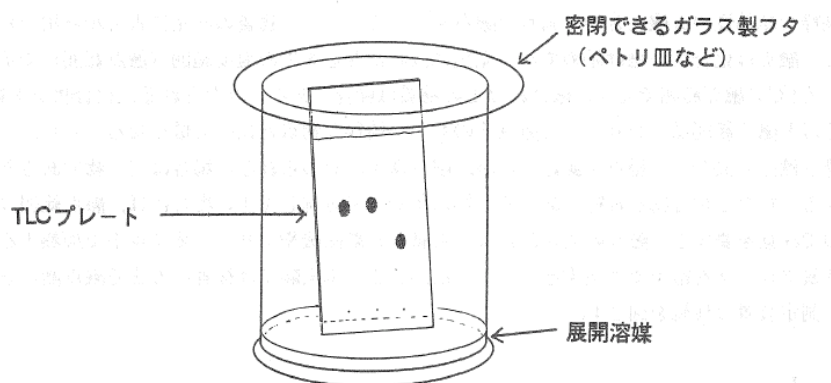


図 3 薄層クロマトグラフィー

- ④ 展開ビンを用意する。円柱形の標本ビンは気密性がよいので便利であるが、高価である。
5 cm x 10 cm の TLC プレートが入るものであれば、インスタントコーヒーやカップ酒などのガラスビンで十分である。必ずガラスシャーレなどを利用して蓋をすること。
- ⑤ 展開ビンに展開溶媒を入れる。溶媒の量は液の深さが約 5 mm になるように調節する。溶媒の組成は、目的物の R_f 値(下記の項目 9 参照)が 0.5 前後になるように調節する。 R_f 値が 0.7 以上や 0.3 以下では分離が悪い。
- ⑥ TLC プレートを展開ビンに入れ、ガラス製のフタをして展開を始める(図 3)。
- ⑦ 溶媒の先端がプレートの上から約 1 cm のところに達したらプレートを取出し、乾かないうちに鉛筆で溶媒の移動先端に印をつける。溶媒をドライヤーなどで乾燥させる。
- ⑧ 紫外線を吸収する発色団を持つ化合物は、暗条件下、紫外線ランプ(254 nm)を照射し検出する。発色団を持たない化合物は、ヨウ素蒸気下で発色させるか、ドラフト内で 5%硫酸エタノール溶液を噴霧した後ホットプレート上約 100°C で加熱し発色させて検出する。発色の色調は化合物に特徴的なことが多い。
- ⑨ 溶媒の先端の移動距離 L と溶質のスポットの移動距離 L_s から移動度 $R_f = L_s/L$ を求める。同じ化合物でも、 R_f 値は一般に、中央のレーンよりも端のレーンの方が、また少量よりも多量スポットした方が大きくなることが多い。そこで、2 つの試料が同じ R_f 値をもつか否かを定めるために、それぞれ単独のレーンで展開するだけでなく、同じ箇所スポットして同一のレーンで展開する方法がしばしば用いられる。この方法を co-chromatography という。

3.1.4. 融点測定

純粋な結晶性の有機化合物は固有の融点をもつことから、物質の同定に古くから用いられてきた。融点は化合物が融け始めてから完全に液状になるまでの温度範囲(融点範囲)で示し、およそ 1°C の融点範囲で完全に融ければその物質は純粋であるとみなされる。化合物が不純になるほど融点範囲は広がり、また融点そのものも純粋な物質と比べて低くなる。したがって、純粋な標品と混合して融点を測定した時、融点降下が認められない場合は同一物であると判断できる。ただし化合物が純粋であっても熱に不安定で分解しやすい場合には、融点範囲は広がるので注意を要する。融点の測定法には、毛細管を濃硫酸やシリコンオイル中で加熱する方法と金属ブロックを電気で加熱する二つの方法があるが、本実験では後者の方法で融点測定を行う。測定装置の外観を図 4 に示す。

方法

- ① 目で見える範囲でできるだけ小さな結晶をスパテルかガラスキャピラリーの先に付着させ、カバーガラスの中心に置く。その上に別のカバーガラスを置き、結晶を 2 枚のカバーガラスではさむ。

- ② 融点測定装置の金属ステージの上に、結晶をはさんだカバーガラスをピンセットで置く。このとき、結晶の位置をステージの中心部に合わせる。ステージを円形のガラス板でおおう。
- ③ ヒーターのダイヤル目盛りをゼロに合わせる(機種によっては Rough および Fine の両方で調節)。右上のライトスイッチを TRS にし Source スイッチを On にすると、金属ステージの中心の小孔が下方からライトで照らされる。ライトの光量は、Dark および Bright スイッチで適当に調節する。
- ④ 結晶がよく見える位置にルーペを固定する。もしも、複数の結晶が見える時は、できるだけ小さなものを選んだ方が測定の精度が高くなる。
- ⑤ 温度計が金属ステージに差し込まれていることを確認したのち、左下のファインダーから温度計の目盛りが見えるように温度計を回す。
- ⑥ ヒーターのダイヤルを回すと、温度上昇が始まる。50 V の設定で、150°C あたりまで温度を上げることができる。時間を節約するため1回目の測定は昇温を速くし、おおまかな融点を測定する。温度上昇に応じて温度計横のミラーをずらしながら、左目で温度計の目盛を、右目で結晶を観察する。結晶の融け始めの温度と融け終わりの温度を記録する。
- ⑦ Source スイッチを Off にし、温度が 50°C 以下に下がるまで待つ。
- ⑧ 再び、Source スイッチを On にする。今度は、融点の約 20°C 下の温度に近づいたところでヒーターの目盛りを下げ、できるだけゆっくりと温度を上げていく。測定機種によっては、ヒーターの Fine のダイヤルを使うと微調整ができる。1分間に約 2°C の昇温が適当である。結晶の融け始めの温度と融け終わりの温度を記録し融点とする。融点は、mp 135 - 137°C のように記載する。
- ⑨ Source スイッチを Off にする。カバーガラスは捨てる。金属ステージの温度が 50°C 以下になったら、装置を片付ける。冷却用の金属ブロックをステージに置いておくと、温度を速く下げることができる。

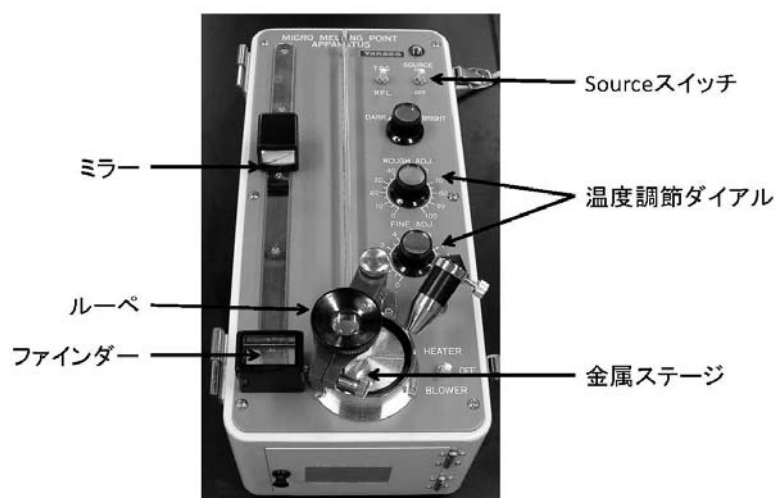


図 4 融点測定装置

3.1.5. 真空ポンプによる減圧システム

学生実験では、真空ポンプを用いた減圧システムによって、減圧ろ過や有機溶媒の回収を行う。

使用上の注意

- ① 器具類をつなぐゴム管は肉厚の耐圧性のものを用いる。ゴム管が古くなって、可塑性がなくなったりひび割れたりしている時は、新しいものに取り替える。
- ② 減圧を終了する時は、デシケーターに接続している場合、まずデシケーターの活栓を閉める。次いで、減圧システムの 2 方コックを閉じ、デシケーターから減圧チューブを外す。デシケーター内を大気圧に戻す時は、デシケーターの活性を静かに開く。このとき、空気の吸い込み口にろ紙を当てておくと空気中のほこりがデシケーター内に入らないだけでなく、粉末試料の飛散防止にもなる。

吸引ろ過実験等 有機溶媒回収システム

概略図 (フラスコ容器、漏斗は参考であり、接続する容器は様々です。システムには含みません。)

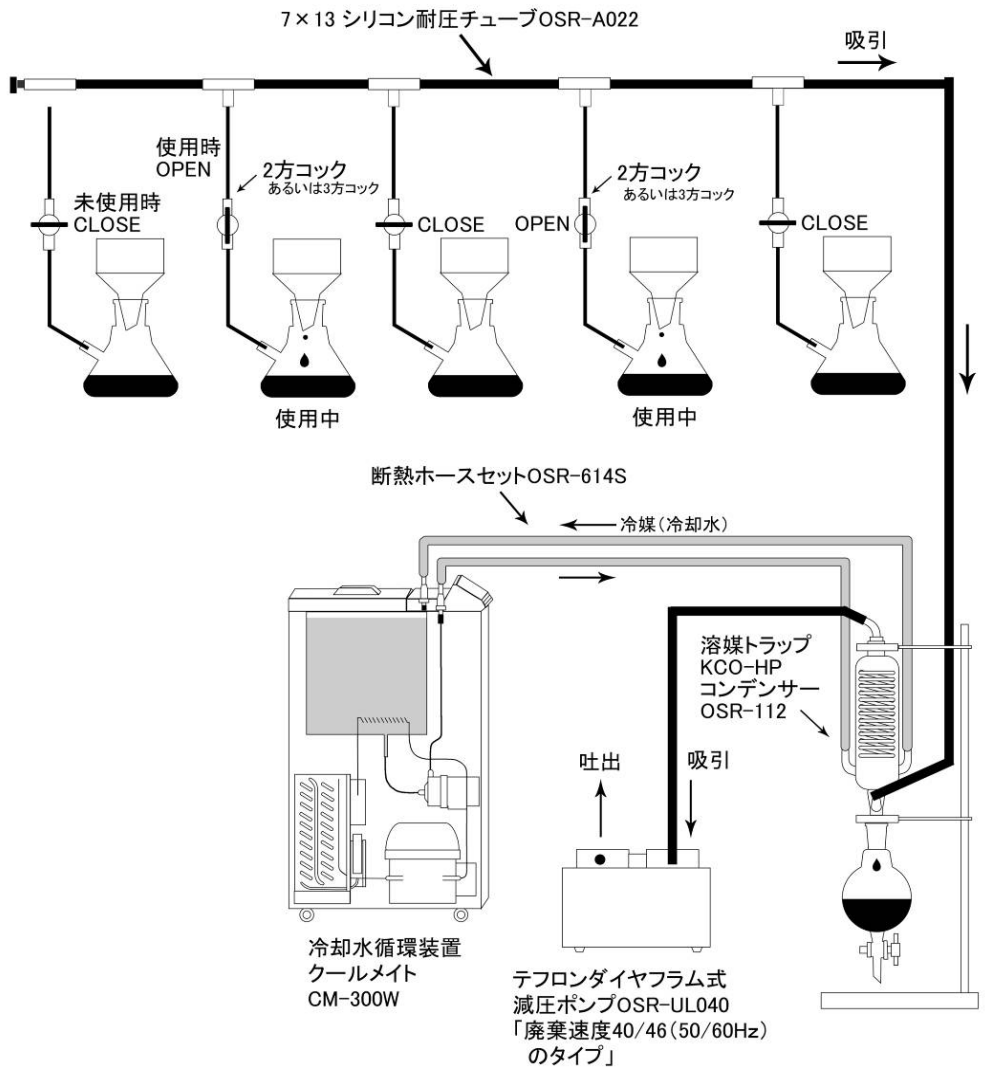


図 5 吸引ろ過実験用有機溶媒回収システム

3.1.6. 吸引ろ過

少量の固形物のろ過にはガラス漏斗を用いるが、大量の固形物はブフナー漏斗とウィットのろ過ビン(図 6)を用いて吸引ろ過する。真空度を保つため、すり合わせ部分を水で濡らしておく(デシケーターとは用途が違うので、すり合わせ面にはグリースを塗らないこと)。

使用法

- ① ろ過ビンに適切な容量の三角フラスコを入れる。
- ② ブフナー漏斗にその内径よりも少し小さいろ紙を敷き、減圧システムによって吸引する。ろ紙を少量の水でぬらし、完全に漏斗に密着させる。目的によって水が使えない時は、メタノール等の他の適当な溶媒でぬらすこと。

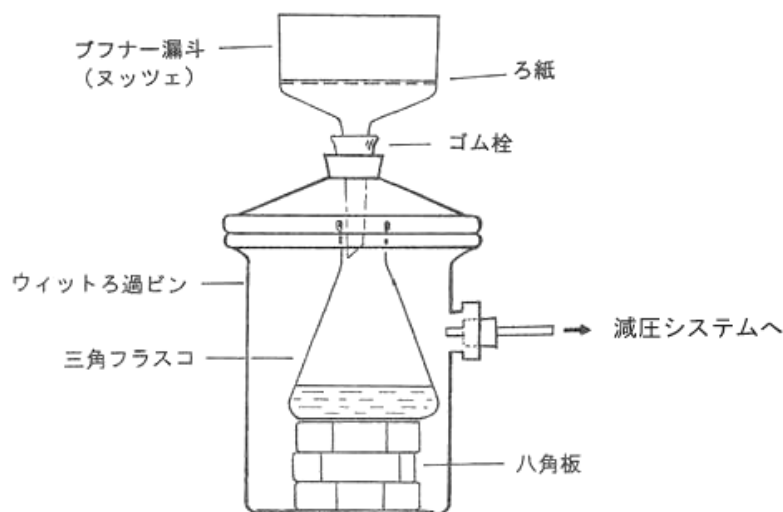


図 6 ブフナー漏斗とウィットろ過びん

- ③ 固形物を含む懸濁液をろ紙上に注ぎ、固形物を適当な溶媒で洗浄する。
- ④ 減圧システムの2方コックを閉じ、固形物あるいはろ液を回収する。

3.1.7. ロータリーエバポレーター

ロータリーエバポレーター(図 7)は、減圧濃縮装置の一種であり、試料溶液に含まれる低沸点(約 100°C 以下)の有機溶媒を留去するために用いる。減圧下では沸点が下がるので、大気圧下よりも低い温度で溶媒を留去することができ、熱による試料への影響も少ない。ただし、溶媒と同じくらいに沸点の低い試料の濃縮には用いることができない。

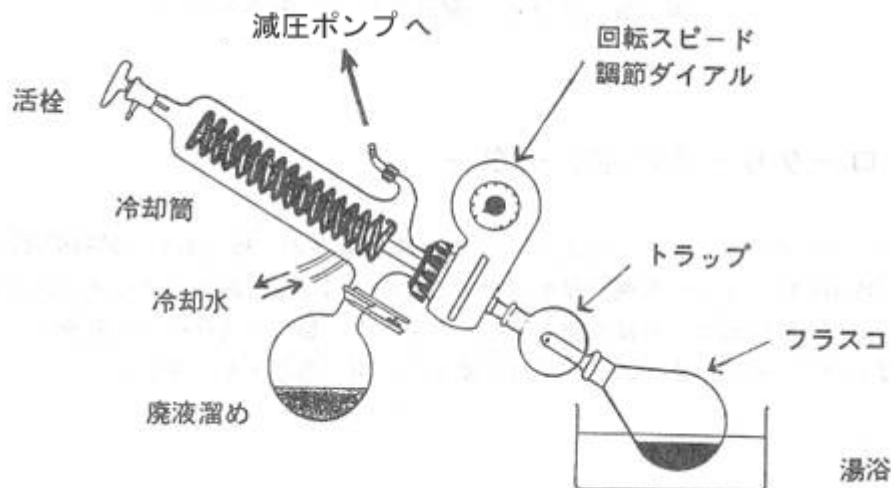


図7 ロータリーエバポレーター

使用法

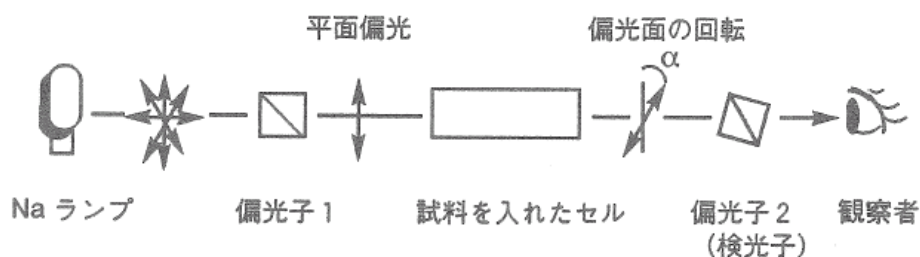
- ① 装置と湯浴の電源を入れ、冷却水を適量流し、減圧ポンプのスイッチを入れてから上部先端の活栓(図7)を閉める。湯浴には常に半分以上の水を入れておくこと。水が少ないと、ヒーターが空気中に露出し非常に危険である。
- ② ロータリージョイントを差し込み、それにトラップを接続する。このトラップは、いったん気化した溶媒がロータリージョイント上部で液化して、フラスコに戻ってくるのを防ぐ。試料を入れたフラスコをトラップに接続する。ロータリーエバポレーターの内部が十分減圧になってフラスコが外れないことを確かめるまで、手でフラスコを支えておくこと。フラスコに入れる試料溶液の量はフラスコ容量の半分以下にすること。入れ過ぎると突沸し、試料が飛散することがある。
- ③ フラスコ部分を半分くらいまで湯浴に浸けてから、ダイヤルを調節してフラスコを適度なスピードで回転させる。この回転は、蒸発面を広くするとともに、突沸を防ぐ効果がある。有機溶媒を留去するときは通常、湯浴の温度は 40 - 50°C に保つこと。
- ④ 蒸発した溶媒は冷却筒で冷却されて液化し、廃液用のフラスコに溜まる。
- ⑤ 試料を濃縮し終わったら回転を止め、冷却筒先端の活栓をゆっくり開いて大気圧に戻した後、トラップから静かにフラスコを引き抜く。濃縮後の試料が粉末の場合、冷却筒先端の活栓を開くと試料が飛散することがあるので、トラップ内部のガラス管にあらかじめ脱脂綿をきつく詰めておくかあるいは、減圧状態のままジョイントからトラップをフラスコごとゆっくり引き抜く。この操作は力を加減しながら慎重に行なうこと。
- ⑥ 装置の使用が終了したら、必ず湯浴などのコンセントを抜き、廃液を所定のポリ容器に捨てておくこと。また、次に使う人のために、ジョイントとトラップは洗浄・乾燥しておくこと。他試料への混入を防ぐため、特にトラップとフラスコのスリ部分は常に清浄に保つこと。

3.2. (±)-1-フェニルエチルアミンの光学分割

3.2.1. 目的

生体成分にはアミノ酸や糖などのように不斉な分子が多い。生物は光学対掌体(エナンチオマー)を区別し、通常その片方しか利用しない。本実験では、光学活性並びに不斉という概念を理解し、ラセミ体を光学分割する方法のひとつを習得する。

分子内に対称面を持たないものを不斉分子といい、*R*, *S* 両エナンチオマーは互いに鏡像関係にある。これら二つの分子の結合角および結合距離は全く等しく、物理化学的性質のうち融点、沸点などは完全に同じである。唯一、異なる物理化学的性質が平面偏光の旋光性である。光の振動が進行方向と直角な特定の方向だけで起こっている光を平面偏光といい、偏光ガラス(ポーラロイド)を通った光がこれに相当する。不斉分子はこの平面偏光の振動の方向を進行軸の回りに一定量回転させる性質(旋光性)を持っている(図 8)。互いに鏡像関係にある二つのエナンチオマーは平面偏光をそれぞれ反対の方向に回転させる。観測者から見て、右に旋光するものが (+)-体、左に旋光するものが (-)-体であり、その回転角度を旋光度という。両エナンチオマーは独立に偏光を回転させるので、光学的に純粋な試料の旋光度がわかっている場合、エナンチオマー組成比が未知の試料の旋光度を測定すれば、その組成比を求めることができる。光学活性とは旋光性を示す試料に対して用いられる表現であり、分子が不斉であっても、両エナンチオマーを等量ずつ含むラセミ体は両者の旋光性が完全に相殺しあって旋光性を示さない。この場合、その試料は光学的に不活性である。



旋光すると偏光子2を回転させなければ観察者には光は見えない。その回転角度が旋光度である。

図 8 旋光の原理

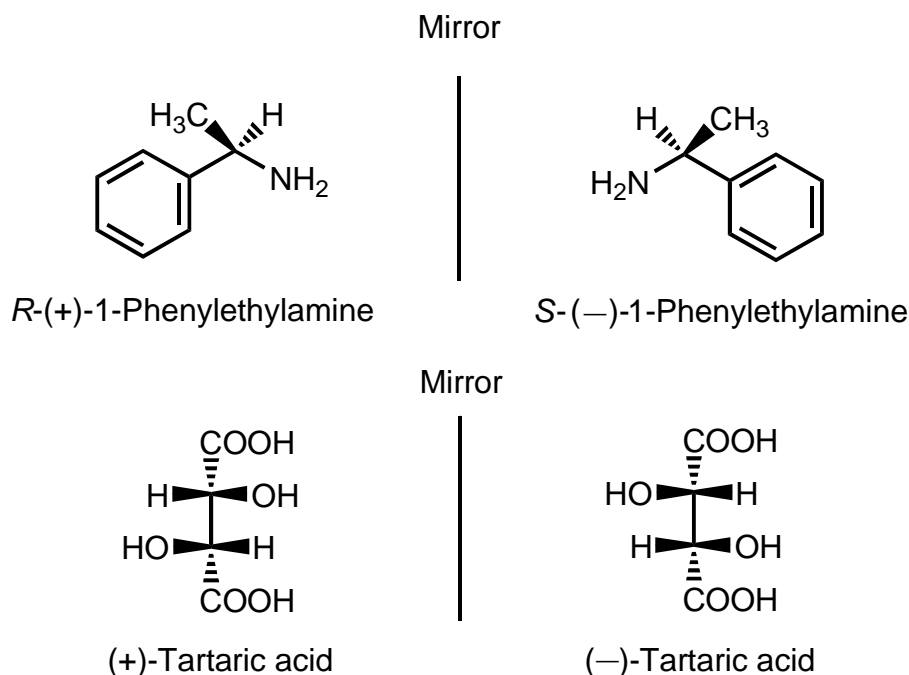


図9 1-フェニルエチルアミンと酒石酸の立体構造

ラセミ体を光学分割する方法にはいくつかあるが、ジアステレオマー塩法は簡便な方法のひとつである。両エナンチオマーと対称分子との反応によって生じる化合物は鏡像関係を保ち、同一の物理化学的性質を示すのに対し、不斉分子との反応によって生じる化合物(ジアステレオマー)は異なった物理化学的性質を示すようになる。本実験では、光学分割すべきラセミ体として(±)-1-フェニルエチルアミン(phenylethylamine)を選び(図9)、不斉分子の(+)-酒石酸(tartaric acid)とジアステレオメリックな塩 [(+)-アミン-(+)-酸の塩と (-)-アミン-(+)-酸の塩] を形成させ、両者のメタノールに対する溶解性の違いを利用して、片方のジアステレオマー塩を分離した後、その塩から(-)-1-フェニルエチルアミンを回収する。光学分割の効率は、比旋光度から算出したエナンチオマー過剰率によって評価する。

3.2.2. 試薬類

(±)-1-フェニルエチルアミン(4.2 ml), 25%水酸化ナトリウム水溶液(5 ml), 無水硫酸マグネシウム(30 g), L-(+)-酒石酸(5.0 g), 酢酸エチル(50 ml), メタノール(80 ml), pH 試験紙

3.2.3. 方法

- ① 100 ml 容のスリ付ナスフラスコに (+)-酒石酸 5.0 g (33 mmol) を入れ、メタノール 65 ml を加える。これに (±)-1-フェニルエチルアミン 4.2 ml (33 mmol) と沸騰石(数個)を加えたのち、ジムロート冷却管を装着し、30 分間湯浴上で加熱還流する。冷却管をはずした後コルク栓でふたをして、そのまま湯浴中で一夜放置することにより、ゆっくり結晶を析出させる。

- ② (-)-アミン-(+)-酸塩のプリズム状結晶が析出していたら、ブフナー漏斗を用いて吸引ろ過によりろ紙上に捕集し、少量のメタノールで洗浄する。しばらく風乾した後、秤量し粗収量を求める。結晶が全く析出しなかった場合は、他の学生の結晶の一部を種として加えて、再び放置してみる。
- ③ 得られた(-)-アミン-(+)-酸塩の結晶を約 18 ml の水によく懸濁し、pH を試験紙で調べながら 25% 水酸化ナトリウム水溶液(約 5 ml)を加えて溶液の pH を 10~12 に調整することにより溶解させる。この溶液を分液漏斗に移し入れ、そこへ 15 ml の酢酸エチルを加えて分配抽出する(一般操作 3.1.2. 参照)。酢酸エチルによる分配抽出は、計 3 回行なう。酢酸エチル層を合一し、分液漏斗に入れ、3 ml の水で 2 回洗浄する。酢酸エチル層を 100 ml 容三角フラスコに入れ、適量の無水硫酸マグネシウムを加えて 30 分間放置し、酢酸エチル中の水を脱水乾燥する。四つ折りろ紙とロートを用い、自然濾過により硫酸マグネシウムを除いたろ液から、ロータリーエバポレーターで酢酸エチルを留去すると(一般操作 3.1.7. 参照)、油状の (-)-1-フェニルエチルアミンが得られる。100 ml 容ナスフラスコの風袋秤量を忘れないこと。これを秤量し、収率を求める。1-フェニルエチルアミンは沸点が低いので、長時間ロータリーエバポレーターで乾燥すると蒸発し、収率が下がる。なお、この性質を利用すれば、(-)-1-フェニルエチルアミンを蒸留によって精製することもできる(沸点 184 - 186°C)。遊離の 1-フェニルエチルアミンは、空気中の炭酸ガスと反応して炭酸塩を作りやすいので、試料は直ちに薬包紙を巻いたコルク栓で密栓して保存すること。
- ④ (この項目の実験は任意)もう一方のエナンチオマーである (+)-1-フェニルエチルアミンは、(-)-アミン-(+)-酸塩を結晶として分離したあとの母液から単離できる。まず母液をロータリーエバポレーターで濃縮した後、残渣を 20 ml の水に溶解する。これに 25% 水酸化ナトリウム水溶液を適量加えて pH を 10~12 に調整し、③と同じ方法で、酢酸エチルによる分配抽出、酢酸エチル層の乾燥、濃縮を行なう。
- ⑤ ③の操作で得た (-)-1-フェニルエチルアミンのうち約 100 mg を 5 ml 容メスフラスコに移す。最終的に 5 ml の標線までエタノールを入れる。このエタノール溶液の旋光度 α を旋光計を用いて 3 回測定し、平均値を求める。旋光度は通常、ナトリウムの D 線の波長 (589 nm) で測定する。比旋光度 $[\alpha]_D$ を次式によって算出する。

$$[\alpha]_D = 100 \alpha / l c$$

α は実測旋光度、 l はセル長 (dm)、 c は濃度 (溶質 g / 溶液 100 ml)

参考: (-)-1-フェニルエチルアミンの比旋光度 $[\alpha]_D -31.0^\circ$ ($c = 2.1$, EtOH, 22°C)

旋光度に影響をおよぼす因子には、試料の性質と濃度、光路長(セル長)、溶媒の種類、温度、および波長がある。セル長および濃度は上述の式に含まれるので、比旋光度を記載する際、溶媒の種類、濃度、温度、および波長をあわせて表示する。比旋光度はその物質固有の値である。

- ⑥ 算出した比旋光度から、得られた 1-フェニルエチルアミンの (-)-体の含有率を計算する。含有率は、光学的に 100% 純粋な (-)-体と (+)-体の比旋光度(エタノール中)をそれぞれ -31.0° ,

+31.0° として計算する。試料の比旋光度は, (-)-体と(+)-体のそれぞれの含有率にそれぞれの比旋光度をかけたものの和である。この含有率から試料のエナンチオマー過剰率(% ee)を算出し, 得られた試料の光学純度を評価する。本法で達成できるエナンチオマー過剰率は通常 80~90% ee である。

$$\text{エナンチオマー過剰率 (\% ee)} = (-)\text{-体の含有率 (\%)} - (+)\text{-体の含有率 (\%)}$$

3.2.4. 参考

- ① 今回実験に使用した (+)-酒石酸のかわりに, (-)-酒石酸を用いたらどのような結果が予想されるか。
- ② 分別した結晶を酢酸エチルで抽出する前になぜ水酸化ナトリウムで溶液をアルカリ性に調整するのか。
- ③ 光学分割には, 今回利用したジアステレオマー塩法の他にどのような方法があるか。代表的な方法は現在 4 種類知られている。最も古典的な方法は, 最初に分子の不斉と光学活性を証明したパスツールが用いた方法である。調べてみよう。
- ④ アミノ酸はグリシンを除いて光学活性な物質であり, L 体と D 体がある。地球上の生物のタンパク質はほとんどが L 体のアミノ酸で構成されている。D 体のアミノ酸や, L 体と D 体の両方のアミノ酸からなるタンパク質をもつ生物は誕生しなかったのだろうか。いろいろな想像をしてみよう。

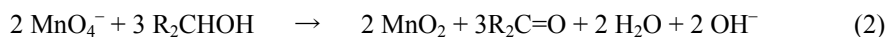
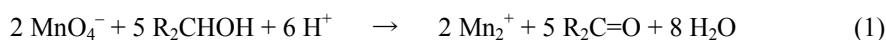
3.3. 酸化反応による甘味剤サッカリンの合成

3.3.1. 目的

有用な生理活性物質の獲得には天然物の探索とともに、有機合成も重要な手段である。合成によって、天然の生理活性物質よりも活性の強い物質を得たり、副作用を軽減し高い選択性をもつ誘導体をつくることができる。3.3, 3.4 の実験では代表的な有機化学反応を利用して、甘味剤のサッカリン (saccharin)、植物生長調節剤の 2,4-D を合成し、その生物活性を検定する。

酸化は有機合成においてしばしば用いられる重要な反応である。代表的な酸化剤には、マンガン化合物や、クロム酸、二酸化セレンなどの金属系試薬と、オゾンや過酸化水素、有機過酸化物などの非金属系試薬がある。それぞれが特徴的な酸化特性をもっているため、目的に応じて最適な酸化剤を選ぶ必要がある。本実験では、サッカリンの合成中間体である *o*-トルエンスルホンアミド (toluenesulfonamide) の芳香環上のメチル基を過マンガン酸カリウムで酸化してカルボキシル基に変換する。通常、メチル基の酸化は困難であり、アルカンのメチル基を効率よく酸化できる試薬はない。しかし、芳香環上のメチル基のように活性化されている場合、カルボキシル基に酸化することができる。

酸化の際、過マンガン酸カリウム (KMnO₄) は、酸性溶液では電子を 5 つ奪ってマンガンイオンに [式 (1)], 中性やアルカリ性溶液では電子を 3 つ奪って二酸化マンガン (MnO₂) になる [式 (2)].



過マンガン酸カリウムは、酸性溶液中で酸化能力が強く選択性に乏しいので、通常、中性かアルカリ性で使用する。サッカリンの合成は 図 10 に示したような経路で行なう。*o*-トルエンスルホンアミドを酸化した後、酸性条件下での環化脱水を経て、最終的にサッカリンのナトリウム塩に導く。

サッカリンは、1879 年に Fahlberg と Remsen によって強い甘味を示すことが偶然に見出された人工甘味剤である。非糖系の甘味剤はショ糖よりもカロリーが低く、糖尿病患者のように食餌制限が必要な人の甘味剤や、ダイエット食品の甘味剤として用いられている。本実験ではサッカリンとショ糖の甘味度の比較試験も行なう。

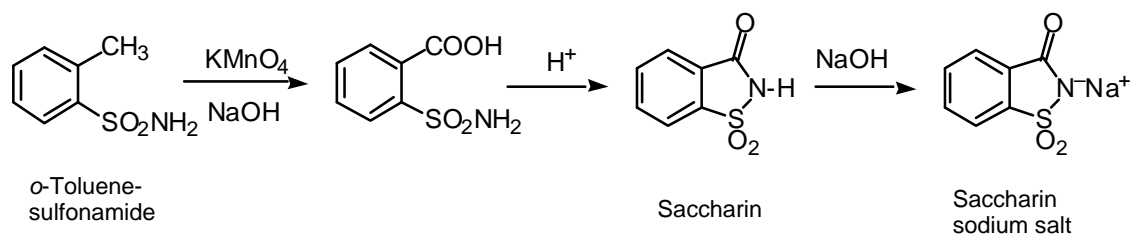


図 10 サッカリンナトリウム塩の合成経路

3.3.2. 試薬類

o-トルエンスルホンアミド(2.0 g), 過マンガン酸カリウム(3.3 g), 亜硫酸水素ナトリウム(0.1 g),
2 M 水酸化ナトリウム溶液(12 ml), 濃塩酸, ショ糖(2.0 g)

3.3.3. 方法

- ① *o*-トルエンスルホンアミド 2.0 g (11.7 mmol)を 50 ml 容三角フラスコに入れ, これに 2 M 水酸化ナトリウム溶液 7.8 ml を加え, よく溶かす. これを水 9.6 ml で希釈する.
- ② 過マンガン酸カリウム粉末 3.3 g (20.9 mmol)を 3 回に分け, 湯せんで約 50°Cに加熱しながら, 約 30 分かけて添加する. この時, ガラス棒で十分攪拌すること. 過マンガン酸カリウムの添加後もしばらく攪拌し, その後室温で一夜放置する.
- ③ 亜硫酸水素ナトリウム約 0.2 g を添加し, よく攪拌して未反応の過マンガン酸カリウムを還元する. 過マンガン酸カリウムが残っているかどうかは反応液を一滴ろ紙に落とし, 周囲にしみ出る溶液の色で判定する. 溶液の色が紫ならば, まだ過マンガン酸カリウムが残っているので亜硫酸水素ナトリウムをさらに加える.
- ④ 反応液をブフナー漏斗で吸引ろ過する. ろ液は無色透明でなければならない. 生じた二酸化マンガンに吸着されている反応生成物を洗い出すために, ろ紙上に残った二酸化マンガンの沈殿をビーカーにとり, できる限り少量の温湯を加えてよく攪拌してかゆ状にし, 再びろ過する. そのろ液を先のろ液と合一する.
- ⑤ 合一したろ液をよく攪拌しながら, そこへ濃塩酸を少しずつ添加して酸性にすると, 白色沈殿が生じる. 白色沈殿が生じなくなるまで塩酸を加える. 約 30 分放置した後, 生じた白色沈殿を減圧下でろ集し, 水で洗浄して塩酸を除く.
- ⑥ この沈殿は未反応の *o*-トルエンスルホンアミドを含んでいるので, これを除くと同時に生成物をナトリウム塩にするため, 沈殿を三角フラスコに移し, まず 10~20 ml の水に懸濁したのち, pH が 8~9 になるまで 0.2 M およびその希釈水酸化ナトリウム溶液を加える. pH が高くなりすぎないように中和点付近では注意して加えること. この操作によって, 目的物は溶解するが, *o*-トルエンスルホンアミドは溶けずに残るので, 不溶物が残存していればこれをろ別する.
- ⑦ ろ液を蒸発皿に入れ, 湯浴上で加熱しながら濃縮・乾固すると, サッカリンのナトリウム塩が白色固体として得られる. これを秤量する(収量約 1.6 g, 収率約 70%).
- ⑧ 回収した二酸化マンガンは指定場所に集めて処理する.

3.3.4. 甘味試験

- ① 合成したサッカリンナトリウム塩の 2%水溶液を調製し、甘味を調べる。ついで水で 2 倍に希釈し再度、その甘味を調べる。甘味を感じなくなるまで 2 倍ずつ希釈し、甘味を呈さない濃度を決定する。
- ② 対照としてショ糖の 2% 水溶液をつくり、それと同じ甘味を呈するサッカリンナトリウム塩の濃度を決定し、ショ糖の何倍甘いかを調べる。

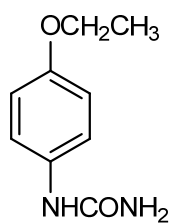
3.3.5. 参 考

- ① サッカリンは塩を構成する陽イオンによって甘味が微妙に変化する。これを酸で処理して得られる遊離型サッカリンは融点 228 - 230°Cである。合成したサッカリンが苦味を示すことがある。これは酸化反応をゆっくり行なった時に副生する、サッカリンの 3 位 *o*-tolylsulfonylimide の混入によるものである。この物質は非常に苦い。
- ② 出発物質として用いた、*o*-トルエンスルホンアミドは次のようにトルエンから 2 段階の反応により得られる。各段階の反応でどのような試薬が必要か。

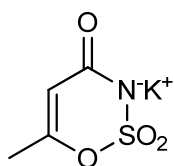


- ③ 過マンガン酸カリウム以外に、*o*-トルエンスルホンアミドの酸化にどのような酸化剤が適しているか。
- ④ 酸化と対をなす反応は還元である。安息香酸のカルボキシル基を還元して、メチル基にするにはどのようにすればよいか。
- ⑤ 図 11 に人工と天然の代表的な甘味剤の構造を示した。甘味物質のなかには毒性が強いため、甘味剤として使用されていないものもある。現在、日本で用いられている非糖系の甘味剤はサッカリンとアスパルテーム、グリチルリチン、ステビオシドなどである。その他にどのような甘味剤があるか調べてみよう。
- ⑥ 低分子甘味剤のほかに、甘味を呈するタンパクとして、西アフリカ原産の植物果実に含まれるタウマチンやモネリンがある。また、それ自身は味を示さず、他の物質の呈味を変える味覚変革物質としてミラクリンやギムネマ酸が有名である。前者は、熱帯産植物の果実に含まれる糖タンパクで、これを口に含んだ後、酸っぱいものを食べると甘く感じさせる。後者は、インド産植物の葉に含まれるトリテルペン配糖体であり、ショ糖などの甘味を感じさせなくする。

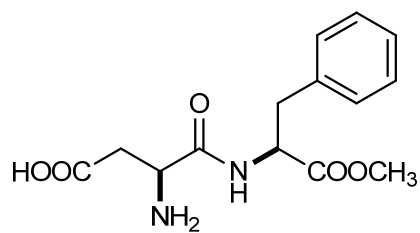
合成化合物



Dulcin

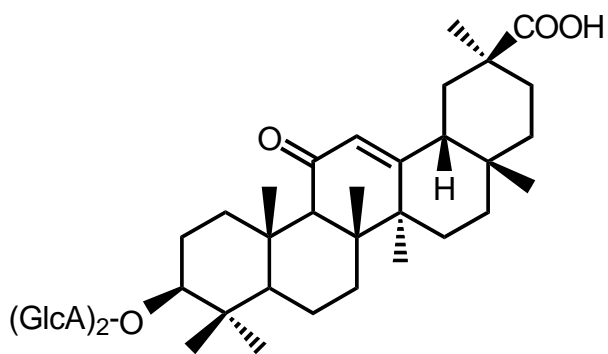


Acesulfame potassium salt

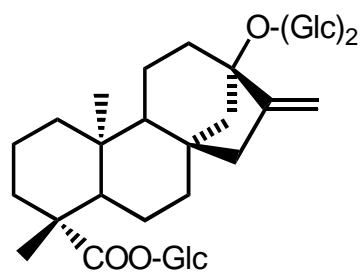


Aspartame
(*N*- α -Aspartyl-L-phenylalanine methyl ester)

天然化合物



Glycyrrhizin



Stevioside

图 11 代表的な甘味剂

3.4. 置換反応による植物生長調節剤 2,4-D の合成

3.4.1. 目的

エーテルの合成には置換反応や付加反応、縮合反応などが利用される。本実験では、置換反応の一種である Williamson 反応を用いて、エーテル化合物の一種である除草剤の 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸 (2,4-dichlorophenoxyacetic acid; 一般名 2,4-D) を合成する。

Williamson 反応は、ハロゲン化アルキル (R-X) のハロゲン (X) をアルコキシド (R'-O⁻) で置換することによってエーテル (R-O-R') を合成する方法である [式 (1)]。



ハロゲン化物の置換のされやすさは、一般に I > Br > Cl の順であり、Cl の反応性は低い。しかし、アリル位 (二重結合の α 位) に Cl が存在する場合、容易にアルコキシドによって置換される。また、触媒量の KI によって反応性が増加する場合もある。

第一ハロゲンがもっとも置換体を生成しやすく、第二や第三ハロゲンはハロゲンの脱離反応が競争的に起こり、オレフィンを副生することが多い。アルコキシドはアルコールのプロトンを塩基で引き抜くことによって生じさせる。アルコキシドの生じやすさは第一 > 第二 > 第三アルコールの順である。アルキルアルコールの場合、塩基として金属ナトリウムや NaH などを用いる。最適な塩基の選択は、アルコールの pK_a と塩基の共役酸の pK_a によって決められる。フェノールは pK_a がおよそ 10 の弱酸であり、水酸化ナトリウムによって容易にアルコキシド (フェノキシド) にすることができる。2,4-D の合成は、図 12 に示したように、塩基として水酸化ナトリウムを用い、2,4-ジクロロフェノールとモノクロ酢酸を反応させることによって行なう。

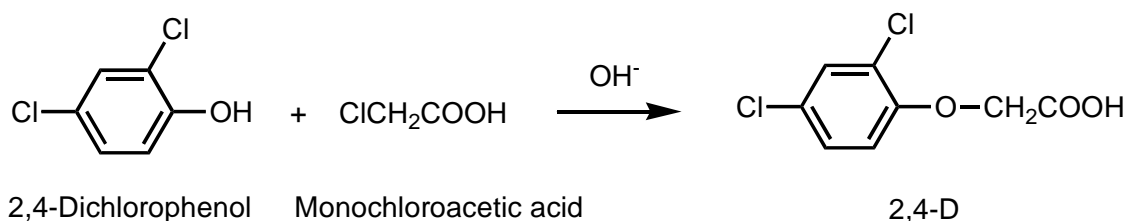
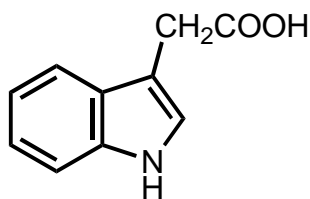
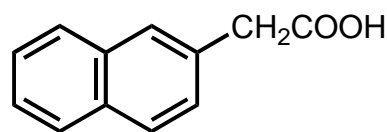


図 12 2,4-D の合成経路

2,4-D は、細胞の伸長や分化を促進する植物ホルモンであるインドール-3-酢酸 (略語 IAA, オーキシンの一つ、構造は図 13 を参照のこと) の合成類縁体である。2,4-D はインドール-3-酢酸よりも代謝不活性化されにくい。そのため、ホルモン作用を過剰に発現して、核酸やタンパク質合成の異常と細胞の異常生長を引き起こし、その結果、生長が停止すると考えられている。2,4-D の生長阻害作用は、広葉植物に対して強く、イネ科植物に対しては弱い。水田における広葉雑草の選択的除草剤として利用されている。本実験では、合成した 2,4-D の植物試験も行なう。



Indole-3-acetic acid (IAA)



1-Naphtaleneacetic acid (NAA)

図 13 天然 (IAA) と合成 (NAA) のオーキシシン

3.4.2. 試薬類

2,4-ジクロロフェノール(1.3 g), モノクロロ酢酸(1.0 g), 9 M 水酸化ナトリウム水溶液(2.1 ml), 2 M 塩酸水溶液(約 10 ml), トルエン(約 20 ml)

3.4.3. 方法

- ① 20 ml 容試験管に, 2,4-ジクロロフェノール(1.3 g, 8.1 mmol)およびモノクロロ酢酸(1.0 g, 10.5 mmol)を入れ, そこへ 9 M 水酸化ナトリウム水溶液を 2.1 ml 滴下する. 発熱して突沸することがあるので注意する. 2,4-ジクロロフェノールとモノクロロ酢酸は, 皮膚につくと激しい痛みを引き起こすので取扱うときは使い捨て手袋を使うこと. もしも誤って皮膚についたときは, 石鹼でよく洗うこと.
- ② 添加後, 沸騰湯浴上で攪拌しながら 30 分間加熱する. 加熱中に反応液が蒸発乾固しないよう必要に応じてごく少量の水を加える.
- ③ 放冷後, 約 10 ml の水を用いて反応液を懸濁しながら 100 ml 容三角フラスコに移す. そこへさらに約 30 ml の水を加えて沈殿物を溶解する. 不溶物が残るようであれば, 溶液を少し加熱する.
- ④ 2 M 塩酸で, 溶液の pH を 1~2 に調整する. 溶液は白濁する. 白濁を生じなくなるまで十分塩酸を加えること. 大部分は白色固体であるが, もしも油状物が一部認められたら, 溶液を氷冷し十分に攪拌しながら, それも固化させる.
- ⑤ 白色固体を目皿を用いて吸引ろ過し, 漏斗上で充分水洗・乾燥した後, さらにデシケーター中で減圧乾燥する(一般操作 3.1.5.および 3.1.6.参照). 乾燥後, 秤量する. 水分は蒸発しにくいので, 乾燥を十分行なうこと. 乾燥が不十分であると次の結晶化がうまくいかない. この段階での収率は約 80%である.
- ⑥ あらかじめ湯煎で熱湯をつくり, 次の操作に入る前にバーナーを消す. 先の粗生成物をよく乾燥した 100 ml 容三角フラスコに入れ, 必要最少量のトルエンを加えて湯浴中で加熱しながら完全に溶かす. これを放冷すると, 無色針状結晶が得られる. 結晶をろ集し, デシケーターで減圧乾燥後, 秤量し収率を求める. 結晶の融点を測定する(一般操作 3.1.4.参照, 融点の文献値 140.5°C).

⑦ 2,4-D の質量スペクトルを測定する

3.4.4. 植物試験

合成した 2,4-D の, レタスの種子発芽に対する阻害作用などを調べる.

- ① 2,4-D の 2.66 mg/ml メタノール溶液を 10 ml 調製する. この際, 超音波処理を行って完全に結晶を溶解する. この 2,4-D 溶液を 1.0 ml とりメタノール 9.0 ml を加えて 10 倍希釈し, 266 mg/L 溶液を 10 ml 調製する. 以下同様に 10 倍ずつの希釈を繰り返し, 26.6, 2.66, 0.266 mg/L の濃度の 2,4-D メタノール溶液を調製する.
- ② 6 枚のシャーレ(直径 9 cm)にろ紙を 1 枚ずつ敷き, それぞれに上記の 2,4-D 溶液ならびに対照として 2,4-D を含まないメタノールを 0.5 ml ずつ添加する. ろ紙を十分風乾した後シャーレにフタをしないでデシケーターに入れ, 減圧下で乾燥し, メタノールを完全に留去する.
- ③ それぞれのシャーレに脱イオン水を 6.0 ml ずつ加える. これにより 2,4-D の最終濃度は 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} M となる. そこへレタス種子を 25 粒ずつ均一に播種し, フタをする. 種子はできるだけ大きさのよくそろったものを選ぶこと.
- ④ シャーレを連続光下 25°C で 2 日間インキュベーションした後, 種子の発芽生育状況を観察する. 活性は 25 粒のうち発芽していないものの割合(発芽阻害率 %)で表す. 2,4-D は 10^{-5} M でもレタス種子の発芽をほぼ 100% 阻害する. より低濃度では, 芽生えの基部が異常生長する. 組織の変化などの状況を約 1 週間にわたり観察する.

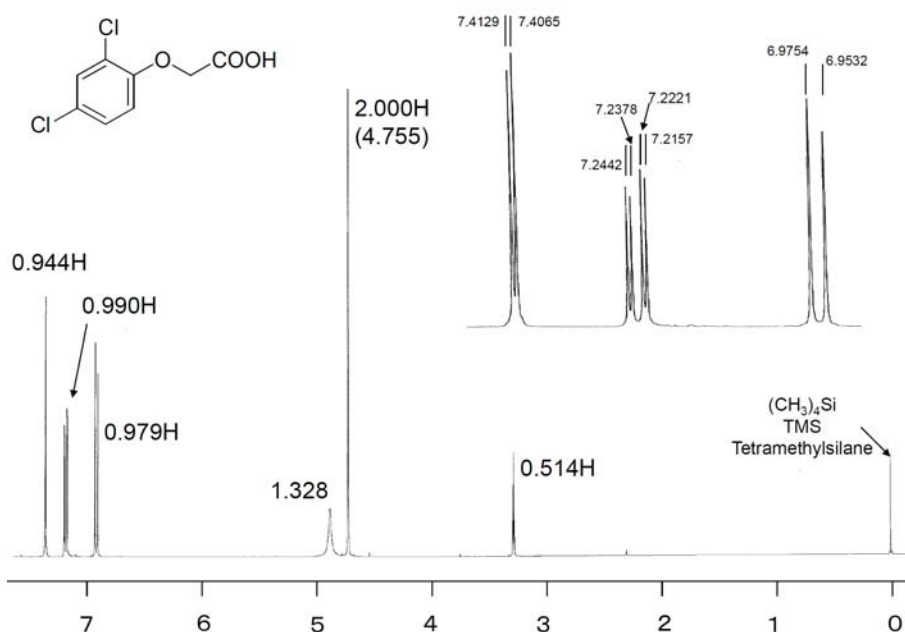


図 14 2,4-D の $^1\text{H-NMR}$ スペクトル (400 MHz, CD_3OD)

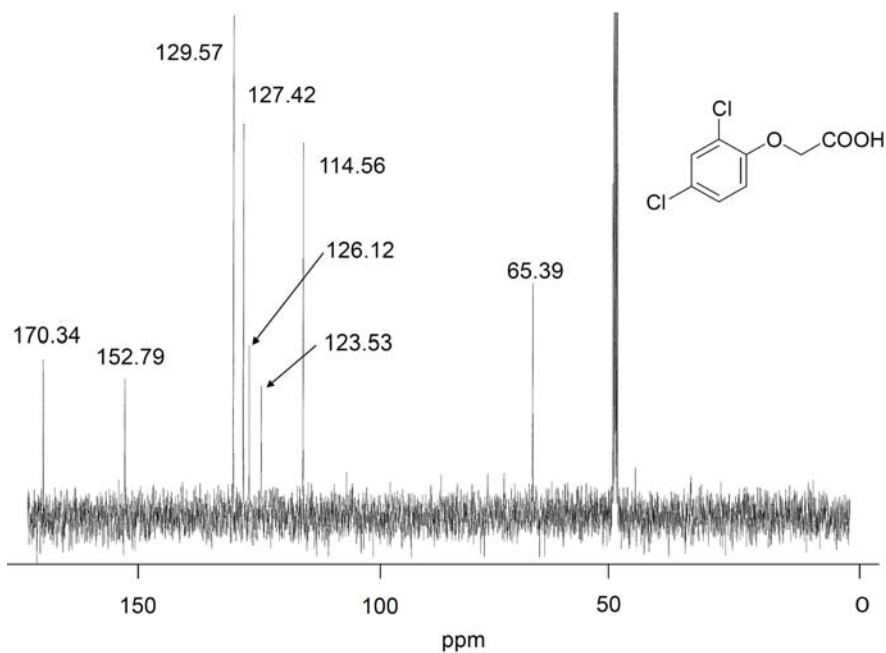


図 15 2,4-D の ^{13}C -NMR スペクトル (100 MHz, CD_3OD)

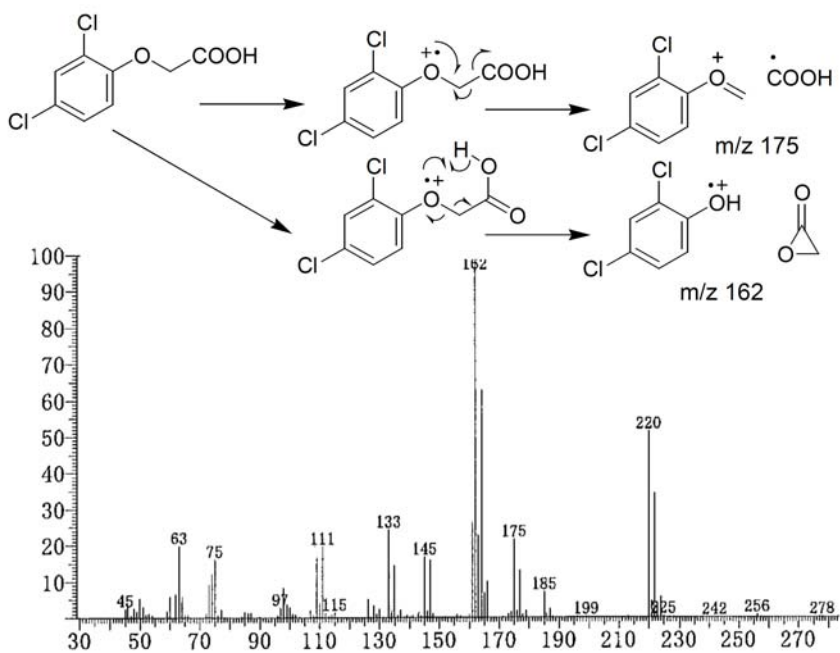


図 16 2,4-D の EI-MS スペクトル (70 eV) とフラグメントパターン

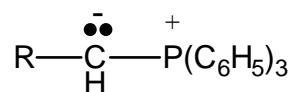
3.4.5. 参 考

- ① 方法 3.4.3.④の操作で、塩酸を加えて酸性にする意味を考えてみること。
- ② フェノールとエタノールの pK_a を比較してみよう。本実験でフェノールの代わりにエタノールを用いて、エトキシ酢酸を合成する場合、塩基として何が適当か。
- ③ モノクロロ酢酸はハロゲン化物であると同時に酸でもあるので、水酸化ナトリウムによって解離型になり、ハロゲンを置換してエステルを生成する可能性がある。しかし、本反応ではエステルは生じない。なぜか。
- ④ Williamson 合成を用いた反応例について調べてみよう。たとえば、*t*-ブチルヘキシルエーテルを合成する時、どのようなことを考慮に入れなければならないか。
- ⑤ イネ科植物が 2,4-D に耐性である理由として、感受性部位である分裂組織機能をもつ維管束形成層をもたないことや、2,4-D の葉面からの吸収と生長点への移行が起こりにくいこと、2,4-D を不活性な物質に代謝することなどがあげられている。2,4-D はどのような代謝を受けるのか。
- ⑥ 2,4-D や、2,4-D と同じ合成オーキシシンであるナフタレン酢酸(略語 NAA, 構造は 図 13 を参照)は、インドール-3-酢酸よりも安定で活性が強いため、そのカルス形成作用を利用して、植物の組織培養にも多用されている。植物の組織培養はいろいろなことに応用されている。
- ⑦ 植物ホルモンには、ジベレリンのように、種なしブドウをつくるために利用されているものもある。その他の植物ホルモンにはどのようなものがあるか調べてみよう。
- ⑧ 2,4-D の質量スペクトルに現れる主要ピークを帰属しよう(塩素同位体の天然存在比に注目)。

3.5. Wittig 反応による *E*-, *Z*-スチルベン の合成

3.5.1. 目的

隣接する正に荷電したリンによって安定化されたカルボアニオンは、求核付加のための有用な反応剤である。このような化学種はリンイリド (phosphorus ylide) と呼ばれ、アルデヒドやケトンと反応させると、イリド炭素とカルボニル炭素が反応してアルケン (炭素-炭素二重結合) が生成する。この反応は、これを開拓したノーベル化学賞受賞者 Georg Wittig にちなんで Wittig 反応と呼ばれる。



Phosphorus ylide

リンイリドの合成は、ハロアルカンから連続する2段階の反応で行うのが便利である (図 17)。第一段階はアルキルトリフェニルホスホニウム塩 (alkyltriphenylphosphonium salt) の生成で、トリフェニルホスフィンによるハロゲン化物への求核置換によって起こる。第二段階では、アルコキシド、水素化ナトリウム、あるいは *n*-ブチルリチウムのような塩基によって脱プロトン化されイリドができる。イリドの安定性は炭素アニオン部位に結合した置換基の種類に大きく依存し、単離可能なイリドもあるが、普通は調製後すみやかに反応剤として使用する。

Wittig 反応の機構はどのようになっているのだろうか。イリドの負に荷電した炭素は求核的でカルボニル炭素を攻撃することができ、双性イオンであるリンベタイン (phosphorus betaine) を生成する。リンベタインの寿命は短く、オキサホスフェタン (oxaphosphetane) をすばやく生成する。次いでこの物質が分解して、生成物であるアルケンとトリフェニルホスフィンオキシドになる (図 17)。Wittig 反応の立体選択性は、イリドの安定性、塩基の種類、用いる溶媒などによって大きく影響される。

本実験では、ベンジルトリフェニルホスホニウムブロマイドとナトリウムアミドの混合物 (いわゆるインスタント・イリド) からイリドを調製し、ベンズアルデヒドとの反応から *Z*-スチルベンおよび *E*-スチルベンの混合物を得る (図 18)。

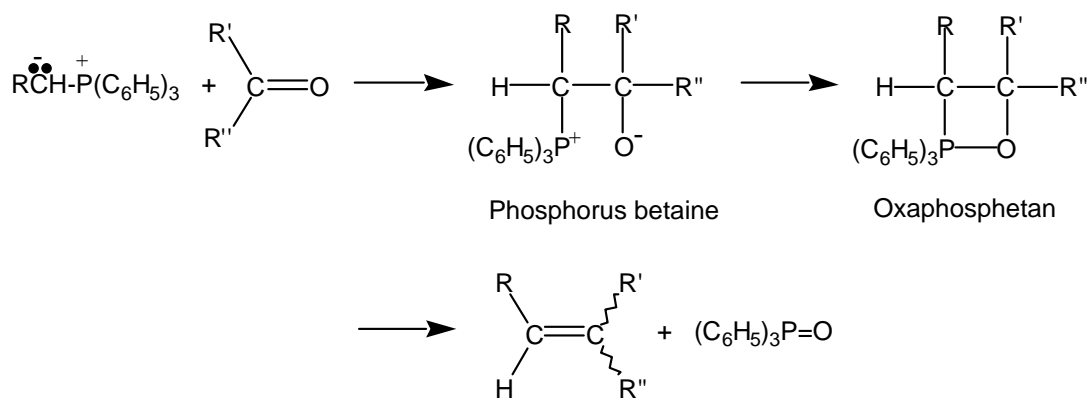
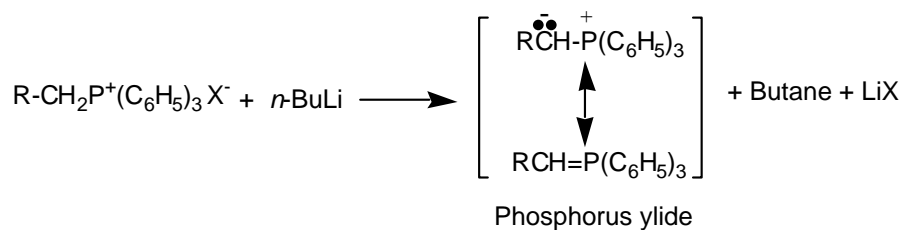
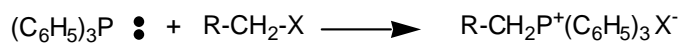


図 17 Wittig 反応の機構

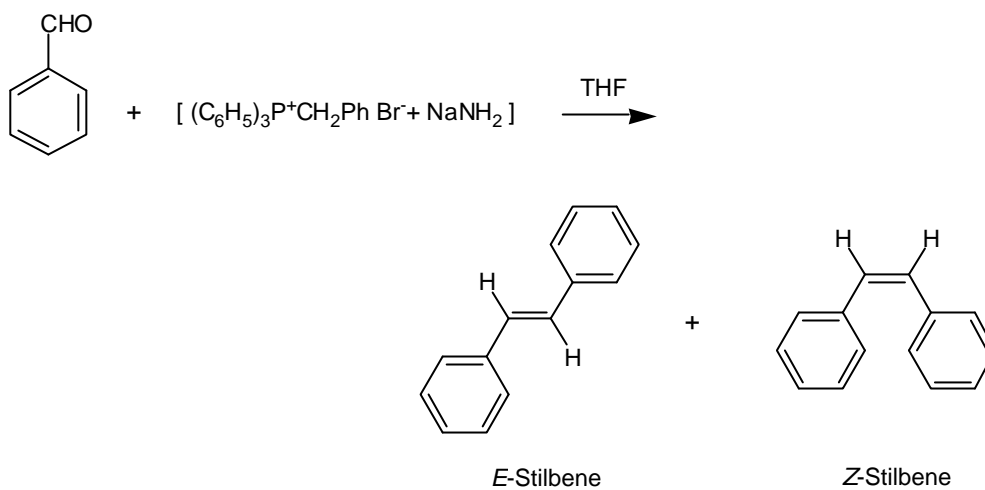


図 18 スチルベンの合成経路

3.5.2. 試薬類

ベンジルトリフェニルホスホニウムブロマイド・ナトリウムアミド混合物 (300 mg), ベンズアルデヒド (83 mg), テトラヒドロフラン (THF, 2 ml), 25% 水酸化ナトリウム水溶液 (1 ml), 2 M 塩酸水溶液 (約 2 ml), ジエチルエーテル (約 20 ml), シリカゲル (Wakogel C-200, 約 12 g), ヘキサン (約 150 ml)

3.5.3. 方法

- ① 乾燥機内で十分に乾燥した試験管 (20 ml 容) にテフロン回転子を入れ, 窒素置換する. ベンジルトリフェニルホスホニウムブロマイド・ナトリウムアミド混合物 300 mg (0.6 mmol) をすばやく秤量し, 試験管に入れる.
- ② ここに 2 ml の乾燥 THF をすばやく加える. 溶解すると同時にイリドが生成することによりオレンジ色に変色する. 変色したことを確認したあと, およそ 5 分間攪拌する. 長く攪拌しすぎると退色が進み, イリドが分解するので注意すること.
- ③ 蒸留精製したベンズアルデヒド 83 mg (0.72 mmol \approx 80 μ l) をすばやく加え, 15 分間攪拌する.
- ④ 25% 水酸化ナトリウム水溶液 (1 ml) を加えて反応を停止する.
- ⑤ 反応溶液を試験管 (10 ml 容) に移す. この時, 約 2 ml のジエチルエーテルを使って完全に洗い込む.
- ⑥ 2 M 塩酸水溶液を加えて水層を中和し, pH を確認する.
- ⑦ 約 3 ml のジエチルエーテルを加えて試験管の中で分液操作を行う. エーテル層はスポイトを用いて取り出し, 50 ml 容三角フラスコに合一する. この操作を 3 回繰り返す. 回収したエーテル層を硫酸ナトリウムで乾燥後, 綿ろ過する. ろ液を TLC (ヘキサン 100% で展開) にスポットし, 生成物を確認する (UV チャンバーで紫外線 λ 254 nm 照射下, 吸収スポットの位置を観察). その後, 50 ml 容ナスフラスコに移し, ロータリーエバポレーターにて濃縮乾固したのち秤量する.
- ⑧ この混合物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにて分離する (方法は 3.7.3. 参照). シリカゲルの量は, 混合物重量のおよそ 100 倍とする. 上記混合物をできるだけ少量のヘキサン (約 2 ml) に溶解させてシリカゲル上に静かにのせ, 完全に吸着させる. この時, トリフェニルホスフィンオキシドはヘキサンへの溶解性が低いために, 大部分が溶解せずに残る. 残ったトリフェニルホスフィンオキシドを無理に溶解してカラムにのせようとしてはいけない. 溶出はヘキサン (100%) で行い, 約 10 ml ずつ試験管に集める. 化合物の溶出パターンを TLC (ヘキサン 100% で展開) で調べる (UV チャンバーで紫外線 λ 254 nm 照射下, 吸収スポットの位置を観察). Z 体と E 体の R_f 値は近いが, R_f 値の大きい方が Z 体, 小さい方が E 体である. 生成物より下に未反応のベンズアルデヒド, 原点付近にトリフェニルホスフィンオキシドが認められることがある.

- ⑨ カラムで分離できなかった *Z* 体と *E* 体の混合フラクションを合一し、ロータリーエバポレーターにて濃縮乾固する。この混合物は、ヘキサンを用いて再結晶化することにより、*E* 体のみを析出させることができる。

3.5.4. 参 考

- ① Wittig 反応は、有用な炭素-炭素結合生成反応のひとつである。Wittig 反応以外に、反応機構が本質的に異なる炭素-炭素結合生成反応の例を少なくとも3つあげてそれぞれの特徴について考察しよう。
- ② Wittig 反応による 1-フェニル-1-ヘキセン (1-phenyl-1-hexene) の合成において、ベンズアルデヒドおよびペンタナール (pentanal) をそれぞれ原料とした場合の反応式を考えてみよう。
- ③ Wittig 反応は全合成研究に盛んに利用されてきた。そのような例を調べてみよう。

3.6. Diels-Alder 反応による 2,3-ジメチルアントラキノンの合成

3.6.1. 目的

Diels-Alder 反応は、アルケンが共役ジエンと反応して 6 員環を形成する [4+2] 環化付加反応であり、6 員環を含む化合物の合成にしばしば利用される。この反応は触媒を必要とせず、通常、熱だけによって進行する。

Diels-Alder 反応は 2 π 電子系のアルケンと 4 π 電子系の共役ジエンの間で協奏的におこるペリ環状電子反応であり、共役ジエンがアルケンに電子を供与することによって結合が生じる。このような電子の供与がおこるためには、基底状態の共役ジエンの HOMO(最高被占分子軌道)とアルケンの LUMO(最低空分子軌道)の対称性が一致する必要がある。共役ジエンの反応性は、HOMO のエネルギー準位を上げるアルキル基やアルコキシ基のような電子供与性置換基によって高められる。一方、アルケンの反応性は、LUMO(最高被占分子軌道)のエネルギー準位を低下させるカルボニル基のような電子求引性置換基によって増加させることができる。Diels-Alder 反応させる場合、アルケンの方に電子求引性置換基を導入しておくことが多い。本実験では、2,3-ジメチル-1,3-ブタジエンと 1,4-ナフトキノンからアントラキノン誘導体を得る反応を行う(図 19)。

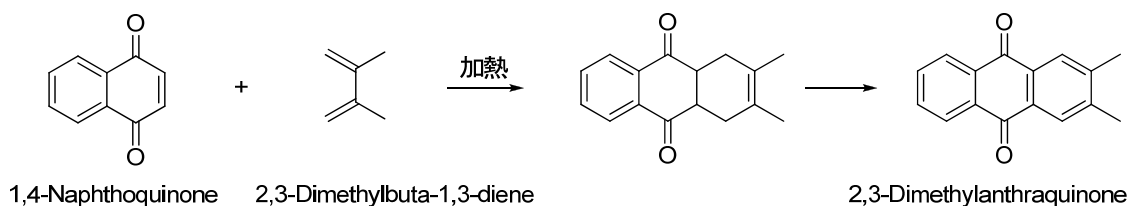


図19 2,3-ジメチルアントラキノンの合成経路

3.6.2. 試薬類

1,4-ナフトキノン(1.0 g), 2,3-ジメチル-1,3-ブタジエン(1.0 g, 揮発しやすいので使用後はフタをしっかりと締めて冷蔵保存すること), エタノール(約 200 ml), トルエン(19.5 ml), 酢酸エチル(0.5 ml), 5% 水酸化カリウムエタノール溶液 30 ml(1.5 g の水酸化カリウムを 28.5 ml の 95% エタノールに溶かして調製)

3.6.3. 方法

- ① 1,4-ナフトキノン 1.0 g (6 mmol, 黄緑色微結晶) と 2,3-ジメチル-1,3-ブタジエン 1.0 g (1.4 ml, 12 mmol, bp 68 - 69°C, 揮発性) を 50 ml 容のナスフラスコに入れ, 6 ml のエタノールを加えてできるだけ溶かす。完全に溶けてなくてもよい。溶液に沸騰石を約 5 粒入れ, フラスコにジムロート冷却管を付けて沸騰湯浴中で, 約 2 時間加熱還流する(接続部, 水流を常に点検し, 引火に十分注意すること)。反応の終点は, 反応液の TLC 分析(溶媒, トルエン:酢酸エチル = 19.5 : 0.5)によって判

断する(一般操作 3.1.3 参照). 生成物の $R_f(0.38)$ は 1,4-ナフトキノン($R_f 0.34$)よりも少し大きい. 出発物質の 1,4-ナフトキノンが完全に消失していたら, 2 時間を経過していなくても加熱を止める.

- ② ジムロート冷却管を外し, フラスコを氷水中に浸けて溶液を冷却する. 白色固体を生じる. 場合によっては, 室温でも少しのショックで溶液全体が固化することがある.
- ③ 白色固体のかたまりをスパテルでできるだけくずし, ブフナー漏斗を用い吸引ろ過する. フラスコ内に残った固体は氷水で冷やした少量のエタノールで洗いこむ. ろ紙上の固体を冷エタノール約 3 ml でよく洗う. 固体を 100 ml 容の三角フラスコに入れ, フラスコを湯浴(沸騰直後の湯)に浸けて加熱しながらできるだけ少量(約 50 ml)のエタノールに溶かす. 室温に一夜静置して結晶化する.
- ④ 生じた白色針状結晶をブフナー漏斗で吸引ろ過し, ろ紙上の結晶を少量の冷エタノールで洗ったのち秤量する. 収量約 1.0 g(収率約 67%). 結晶の融点を測定する(mp 145 - 147°C).
- ⑤ 結晶 0.5 g を 100 ml 容三角フラスコに入れ, 5% 水酸化カリウム-エタノール溶液 10 ml を加えて結晶を溶かす. 溶液は濃い茶緑色を呈する. 溶液全体ができるだけ空気と触れるようにマグネチックスターラーで攪拌する. しばらくすると溶液の表面に黄色い固体が生じてくる. 溶液全体が黄色を呈するまで約 1 時間かかる. 反応途中に溶液を TLC(溶媒は上記と同じ)で分析すると, 酸化中間体と推定される物質(R_f は最終生成物より少し大きい)のスポットが最初増加しやがて減少する. それとともにそれよりも少し R_f の小さい最終生成物($R_f 0.43$)が増加してくる.
- ⑥ 反応終了後, 黄色固体を含む反応液を, あらかじめ水で湿らせたろ紙を用いてブフナー漏斗で吸引ろ過する. フラスコ内に残った黄色固体を水でよく洗い込むこと. ろ紙上の黄色固体を脱イオン水, 続いてエタノールでよく洗浄する.
- ⑦ 黄色固体を 300 ml 容三角フラスコに入れ, 湯浴で加熱しながらできるだけ少量のエタノール(約 100 ml)に溶かし, 一夜静置する. 紫色の針状結晶が生成する. 場合によっては同時に黄色の針状結晶も生じることがあるが, これは結晶構造が違うだけで同一物質である.
- ⑧ 溶液を結晶ごとブフナー漏斗で吸引ろ過し, 結晶をデシケーターに入れ約 1 時間減圧乾燥後, 秤量する. 収量 0.31 g(収率 63 %). 2 種類の結晶が得られたらそれぞれの結晶の融点を測定する. いずれも同じ融点を示す(mp 209 - 210°C).
- ⑨ ④で得られたテトラヒドロ体と⑧で得られた最終生成物の UV スペクトルを次の要領で測定する.

3.6.4. UVスペクトルの測定

- ① 希釈には必ず「UV測定用」メタノール(特級)を用いること. いずれの化合物も約 3 mg を正確に秤量(葉包紙上)する. それぞれ試験管に化合物を入れ, 秤量した量に応じてメタノールを加え, 最終濃度 0.25 mg/ml の原液を調製する. 原液 0.2 ml を別途試験管に取り, 次いでメタノール 9.8 ml を加え 0.05 mg/10 ml (0.005 mg/ml) の濃度溶液を作製する.

- ② 試料溶液およびブランク(メタノール)をそれぞれ石英セルに入れる。ダブルビーム計測器の場合、一方のセルホルダーにブランク、他方にサンプル溶液を挿入する。マニュアルに従って測定する。記録範囲は、230～450 nm とする。いずれの化合物も2つの吸収帯をもつ。それぞれの吸収帯の極大波長(λ_{\max} , nm)と吸光度(A: absorbance)を読み取る。各試料の吸収極大におけるモル吸光係数(ϵ)を算出する。

$$\text{モル吸光係数 } \epsilon = A / cl$$

A = 観測吸光度, c = 試料濃度(M), l = セル長(cm)

3.6.5. 参 考

- ① Diels-Alder 反応の機構と各反応生成物の立体化学について考察しよう。
- ② 自然界のアントラキノン類について調べてみよう。
- ③ 2,3-ジメチルアントラキノンとテトラヒドロ体の UV・可視吸収スペクトルから化学構造との関連について考察しよう。

3.7. 植物に含まれる抗菌物質の単離と構造決定

3.7.1. 目的

スギやヒノキとならんで、ヒノキ科のサワラ(学名 *Chamaecyparis pisifera*)も昔から寿司飯用の飯台や風呂桶の材料として、また餅の飾りに使われてきた針葉樹である。サワラを含め、人々がこれらの材を利用してきたのは、その木目の美しさだけでなく、それらが腐りにくく耐久性に優れている天然の抗菌性素材であることに気づいていたためと思われる。実際、サワラに抗菌物質(ピシフェリン酸, 図 20)が含まれていることが明らかにされている。本実験では、サワラの葉からその抗菌物質を単離し抗菌活性を調べるとともに、NMR (nuclear magnetic resonance, 核磁気共鳴), MS (mass, 質量), UV (ultraviolet, 紫外), IR (infrared, 赤外)の各種スペクトル分析によってその化学構造を解析することを目的とする。

3.7.2. 試薬類

メタノール(500 ml), 酢酸エチル(500 ml), トルエン(500 ml), 2 M 塩酸水溶液(20 ml), 0.1 M 水酸化ナトリウム水溶液(250 ml), シリカゲル(Wakogel C-200, 30 g), 無水硫酸ナトリウム(30 g), 5% 硫酸エタノール溶液(TLC 用), pH 試験紙

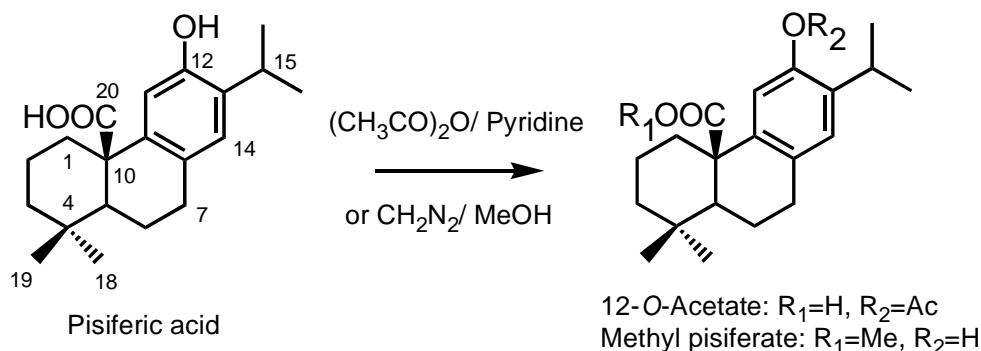


図 20 ピシフェリン酸の構造と誘導体化

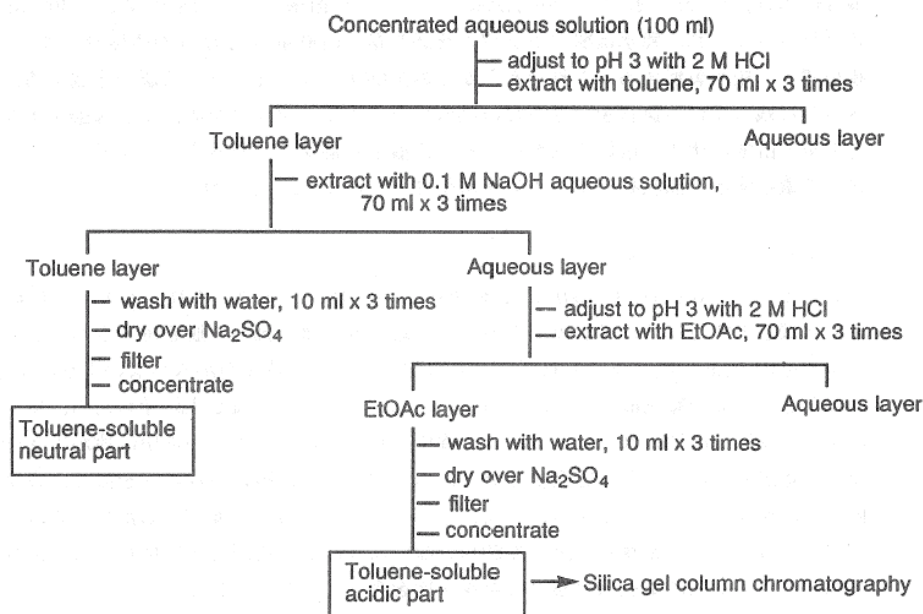


図 21 濃縮水溶液の分配抽出操作

3.7.3. 方法

① 抽出と溶媒分配(図 21 参照)

- i. サワラ枝葉部 100 g を適当な大きさに切って 500 ml 容ポリ容器に入れ、メタノール約 400 ml を加えて浸漬し、少なくとも 1 週間室温に放置する。抽出液を綿ろ過し、ろ液を 1 L 容ナスフラスコに入れて、ロータリーエバポレーターで約 50 ml まで減圧濃縮する(一般操作 3.1.7.参照)。
- ii. 濃縮液に水を加えて全量約 100 ml にし、2 M 塩酸水溶液で pH 3 に調整する。これを 200 ml 容分液漏斗に移し入れる(一般操作 3.1.2.参照)。フラスコ内に残った部分を少量の水で洗いこむ。水に溶けない部分は、少量のトルエンで洗いこむ。
- iii. 分液漏斗にトルエン 70 ml を入れ、軽く振って分配抽出する(あまり強く振ると乳化する)。界面が安定したら、下の活栓を開けて水層を 200 ml 容三角フラスコに移す。トルエン層は上の栓を開けて上から別の 200 ml 容三角フラスコに移す。水層を再度分液漏斗に入れ、新しいトルエンを 70 ml 入れ、同様に分配操作を行なう。この分配抽出をもう一度繰り返す(計 3 回)。水層は念のため、実験終了まで保存しておく(捨てる時は中和してから流すこと)。
- iv. 得られたトルエン層約 210 ml を分液漏斗に入れ、これに 0.1 M 水酸化ナトリウム水溶液 70 ml を加えて分配抽出する。0.1 M 水酸化ナトリウム水溶液による分配抽出をさらに 2 回行なう。分配後のトルエン層はトルエン可溶性中性部として保存しておく。0.1 M 水酸化

ナトリウム水溶液層を合一後、2 M 塩酸水溶液で pH 3 に調整し、1 回あたり約 70 ml の酢酸エチルを用いて、計 3 回分配抽出する。酢酸エチル層を合一して分液漏斗に入れ、10 ml の水で計 3 回分配洗浄する。この酢酸エチル層を乾燥した 300 ml 容三角フラスコに入れ、無水硫酸ナトリウムを適当量(溶液量の約 1/10 の体積分)加えて、一夜放置し、脱水乾燥する。

- v. これを目皿で吸引ろ過する。フラスコ内に残っている試料をできるだけ回収するために、フラスコの内壁と硫酸ナトリウムも少量の酢酸エチルで最低 3 回洗い、その洗液もろ過する。ろ液を 300 ml 容ナスフラスコに入れて濃縮し、最終的に 50 ml 容ナスフラスコに移し替えて濃縮・秤量する。ロータリーエバポレーターで濃縮すると油状物(トルエン可溶性部)が 1~2 g 得られる。

② シリカゲルカラムの作製

シリカゲル 20 g (Wakogel C-200) を 200 ml 容三角フラスコに入れ、トルエンを適量加えて懸濁液とする。活栓付きガラスカラムの最下部の細い部分に脱脂綿をきつく詰め、トルエンを約 5 cm の高さまで入れる(これはゲルを入れる時気泡が入らないようにするためである)。先の懸濁液をカラムに流し入れる。このとき、流し入れ始めたら、気泡が入らないように一度に入れてしまうこと。途中で止めると、カラムの途中に段ができやすくなり分離が悪くなる。ゲルを充填し終えたら、ゲルと同体積のトルエンを流し、カラムを軽くたたきながらゲルができるだけ密に詰まるようにする。一度充填したカラムは、ゲル上端に十分トルエンを残し、決して涸らさないようにして使用時まで保存する。保存する時は、カラム上端に葉包紙を巻いたコルク栓できつく栓をしておくこと。

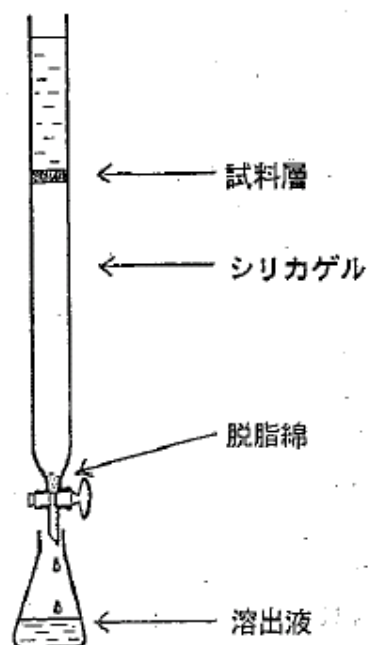


図 22 カラムクロマトグラフィー

③ 精製と結晶化による単離

①の操作で得られた油状物を約 1 ml の酢酸エチルに溶解し、そこへ 約 2 g のシリカゲルを加えて溶液を全て吸収させる。シリカゲルは湿った状態になる。これをロータリーエバポレーターによって乾燥させる。このときロータリーエバポレーターのトラップ内のガラス管部に脱脂綿をきつく詰めておくこと(ゲルの飛散防止)。試料を吸着した乾燥ゲル粉末に少量のトルエンを加えて、懸濁液にする。

先に作製したシリカゲルカラムの活栓を開いて、ゲル上端ぎりぎりまでトルエンの液面を下げる。試料を吸着したゲルの懸濁液をスポイトを用いて、ゲル上端に静かにのせる。フラスコ内に残ったゲルは少量のトルエンを用いてできるだけ洗いこむ。溶出は、トルエン中の酢酸エチルの濃度を 0, 5,

10, 15, 20% (v/v)と段階的に上昇させて行なう。フラクションひとつの溶出量はゲル体積の約 1.5 倍とする。調製した各混合溶媒を順次加えながら溶出する。カラム下端から溶出した液はフラクションごとに 100 ml 容三角フラスコで受ける (図 22 参照)。

各フラクションを少量ずつガラスキャピラリーでとり、TLC プレートにスポットする(一般操作 3.1.3. 参照)。TLC プレートをトルエン:酢酸エチル:酢酸 = 8 : 2 : 0.1 の混合溶液で、展開する。約 8 cm 展開したら、薄層を取り出して十分に乾燥し、UV チャンバーで紫外線 (λ 254 nm) 照射下、吸収スポットの位置を観察する(鉛筆でうすく印をするとよい)。次にドラフト中で、5% 硫酸エタノール溶液をスプレーする。これをホットプレート上で加熱し、ピシフェリン酸の溶出フラクションを確認する。ピシフェリン酸は、 R_f 約 0.5 で灰褐色に発色する。通常、ピシフェリン酸は 15% 並びに 20% 酢酸エチル画分に溶出する。10% あるいは 15% 酢酸エチル画分にはピシフェリン酸の 12-*O*-メチル化体が溶出する。

ピシフェリン酸を多く含むフラクションをロータリーエバポレーターで濃縮する。最終的に、30 ml 容のナスフラスコで濃縮乾固するが、濃縮後の重さを忘れずに秤量すること。ナスフラスコを熱湯中で加熱しながら、できるだけ少量のトルエンに溶解する(湯煎で熱湯をつくった後はバーナーの火を消しておくこと)。溶解後、薬包紙を巻いたコルク栓で軽く栓をして、静かに室温に放置しておく、ピシフェリン酸の無色プリズム状結晶が生成してくる。結晶を吸い取らないよう、上澄液だけをスポイトで注意深く吸い取る。残った結晶にできるだけ少量のトルエンを加えて結晶を洗浄する。洗浄したトルエンもできるだけスポイトで吸い取る。この結晶の洗浄操作をもう一度行う。多量のトルエンを使うと、結晶が再び溶けて収率が下がる。洗浄した結晶をフラスコごとデシケーター中で減圧乾燥し(一般操作 3.1.5. 参照)、秤量する。

もしも、ピシフェリン酸の 12-*O*-メチル化体を純粋に含むフラクションが得られたら、希望者は、これもスペクトル分析と抗菌試験を行なうことができるので、濃縮秤量して保存しておくこと。

④ 融点測定

ごく少量(目で見える程度)のピシフェリン酸の結晶を用いて融点を測定する(一般操作 3.1.4. 参照)。純度の低いものほど、融点は低い。文献値は 160°C である [H. Fukui et al., *Agric. Biol. Chem.*, 42, 1419 (1978)]。

⑤ スペクトル分析

ピシフェリン酸の ^1H および ^{13}C NMR, MS の各スペクトルを測定する。NMR と MS 測定は代表的な試料、数検体について行ない、化学構造を確認する。図 23~25 にピシフェリン酸標品の各スペクトルを示した。

3.7.4. 抗菌試験

① 菌寒天の作成

肉エキス(1 g)、酵母エキス(1 g)、塩化ナトリウム(50 mg)を 1 L 容ビーカーに入れ、1 L の脱イオ

ン水に溶かす。pH メーターを用い、1 M 塩酸水溶液か 1 M 水酸化ナトリウム水溶液で pH 7 に調整する。これを 20 ml 容試験管 8 本(うち 2 本は予備)に 5 ml ずつ入れ、シリコン栓をして 120°C で 15 分間オートクレーブする。保存スラントから枯草菌(*Bacillus subtilis*)を白金耳で少量かきとり、試験管内の液体培地に植菌する(クリーンベンチ内)。これを 28°C で一夜振とう培養する。

先に調製しておいた培地を 500 ml ずつ 1 L 容三角フラスコに入れ、これに 15 g/L の寒天を加え、口を二重のアルミホイルで覆って 120°C で 15 分間オートクレーブする。オートクレーブから取り出して、培地が約 50°C まで冷めてきたら、試験管で培養しておいた枯草菌を培地 500 ml あたり 1 本ずつ加え、ゆるやかに振り混ぜて均一にする。これをただちにクリーンベンチ内で、滅菌ポリシャーレに約 13 ml ずつ分注する。このとき、培地の温度が高すぎると枯草菌が死に、逆に低すぎると分注の途中で培地が固まってしまう。分注後、培地が固まるまで静かに放置する。これで 50 – 60 枚の菌寒天培地入りシャーレを作成することができる。

② 抗菌試験

所定量のピシフェリン酸を含むメタノール溶液をパルプディスクに吸収させる(1 枚のディスクあたり 3, 10, 30, 100 µg)。これをよく風乾し、先の菌寒天培地上に等間隔に置く。その際、雑菌の混入を防ぐために、シャーレの上フタは完全に開けず、少し開いた隙間からディスクをピンセットで挟んで入れる。1 枚のシャーレあたり、7 枚のディスクが並べられる。シャーレを 28°C で一夜インキュベートする。このとき、シャーレを裏返しにしておくこと。これは結露水がフタから培地上に落ちるのを防ぐためである。抗菌活性があれば、ディスク周辺に菌の生育していないゾーンが透明に抜けて見える。菌が生育したところは白濁する。菌生育阻止円の直径を測る。ピシフェリン酸が活性を示す最低濃度は 8 µg/disc である。被験物質として、ピシフェリン酸の他に、各自採取した植物(例えば、サクラの葉)のメタノール抽出液、円形に切り取った葉の切片などについて抗菌活性を調べてみよう。

3.7.5. 参 考

- ① ピシフェリン酸は、イソプレン(図 26 参照)と呼ばれる炭素数 5 個の単位で構築されているテルペノイド(terpenoid, テルペン類)の一種である。テルペンはイソプレン単位の数によって、次のように分類されている。2 単位 = モノテルペン、3 単位 = セスキテルペン、4 単位 = ジテルペン、5 単位 = セスタテルペン、6 単位 = トリテルペン、8 単位 = カロチノイド。コレステロールのような炭素数 27 個のステロイドもトリテルペンの二次的な修飾によって生合成される。ピシフェリン酸並びに図 26 に示したテルペンがどれに属するもので、イソプレンによってどのように構築されているか考えてみよう。テルペンには生理活性をもつものが多く、生活や産業との関りが深い。その他にどんなテルペンがあるか調べてみること。
- ② 図 20 のように、ピシフェリン酸を誘導体に導くことができる。このような生成物から官能基などについての重要な知見が得られる。ピシフェリン酸との比較において、アセチル化物、メチル化物の各スペクトル(¹H および ¹³C NMR, MS, IR)の特徴を予想してみよう。

- ③ 『ピシフェリン酸の 12-O-メチル化体のメチル基が, 12 位酸素に結合して、20 位のカルボキシル基に結合(すなわちメチルエステル)しているのではない』ということを証明したい. どのようにすればよいか.
- ④ 身の回りで, 抗菌作用を利用していると思われるような伝統的な天然の材料はないか考えてみよう. ちょっとしたきっかけから新しい天然の生理活性物質が見つかるかも知れない.

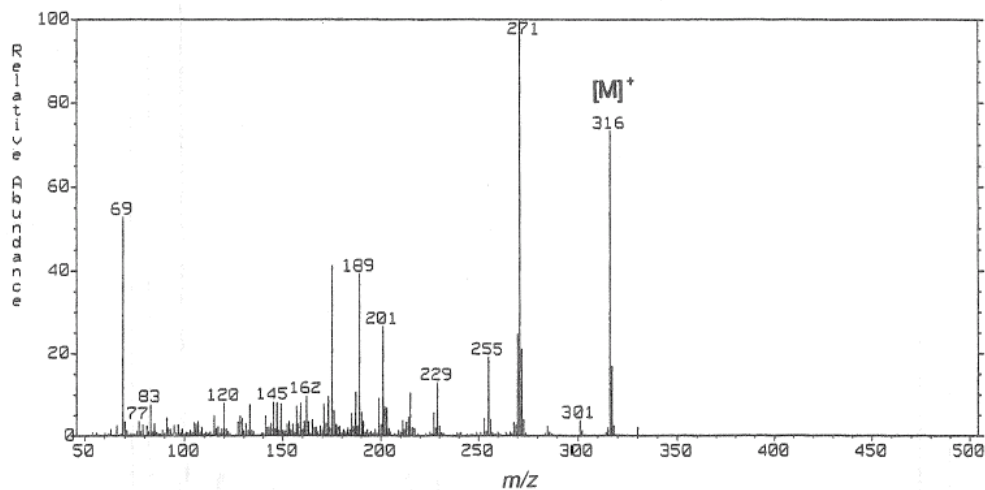


図 23 ピシフェリン酸の EI-MS (70 eV) スペクトル

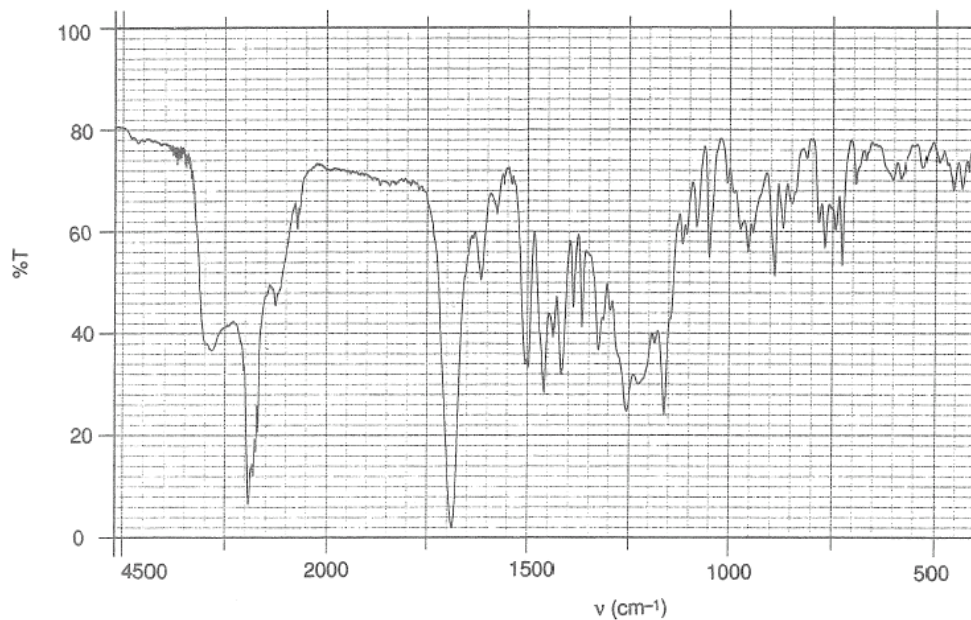


図 24 ピシフェリン酸の IR スペクトル (KBr)

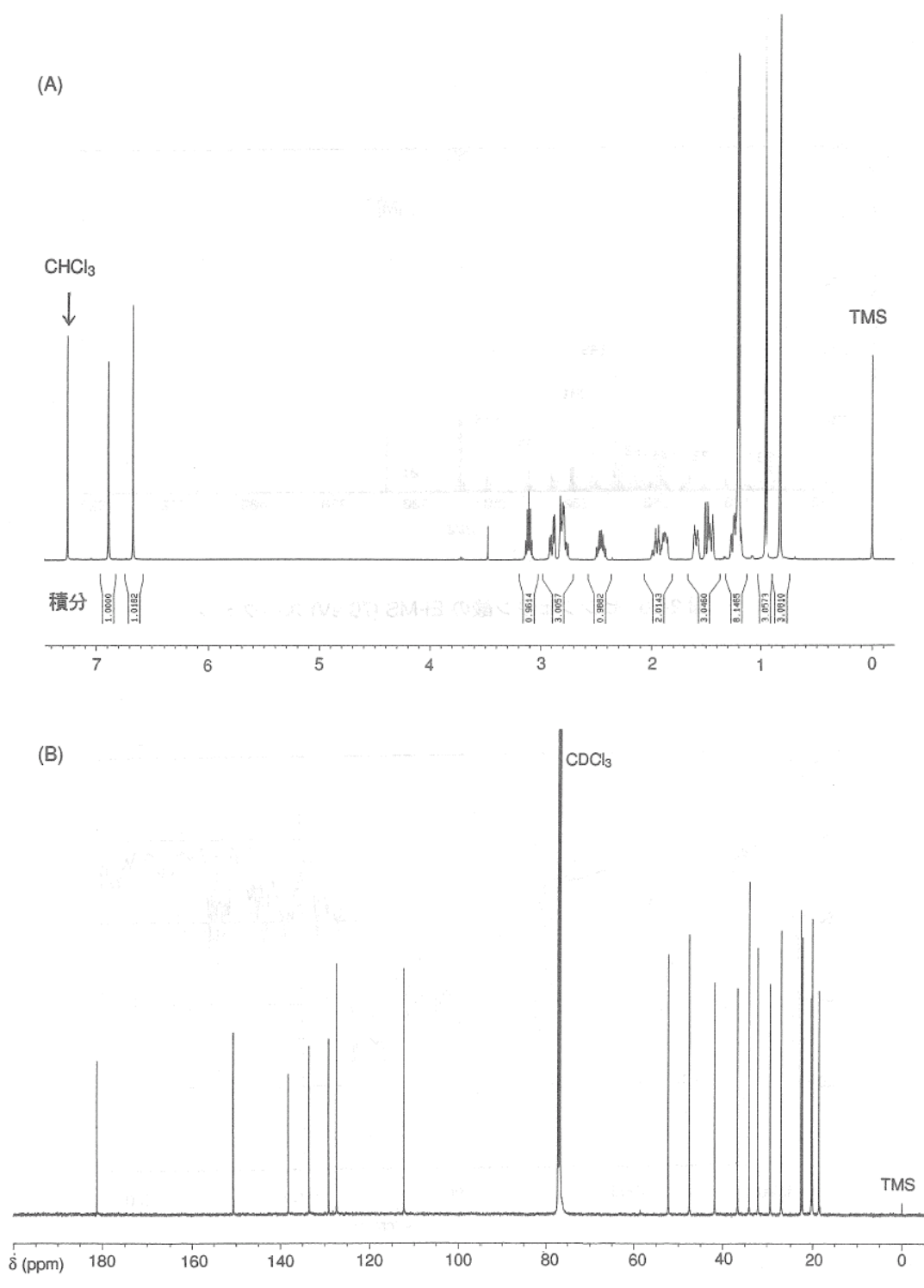


図 25 ピシフェリン酸の (A) ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) および (B) ^{13}C NMR スペクトル (125 MHz, CDCl_3)

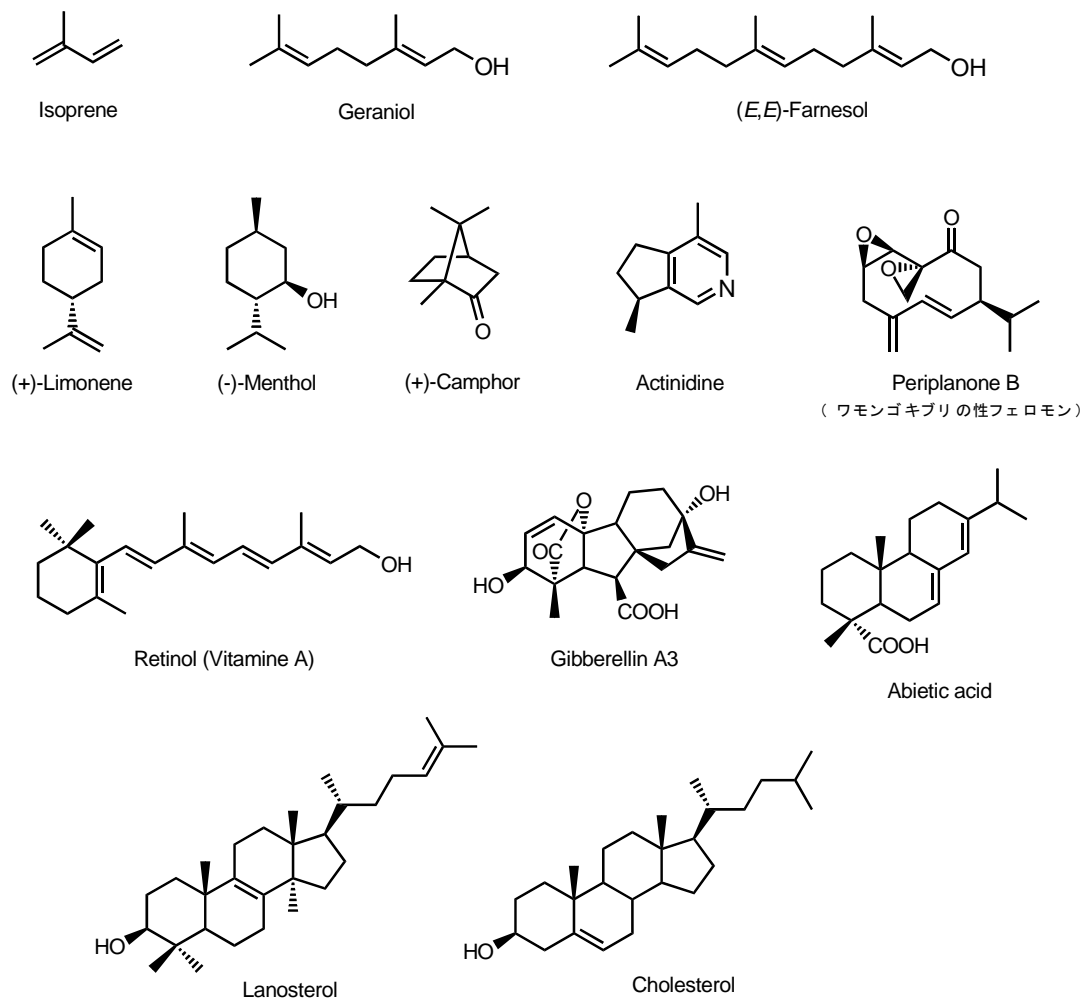
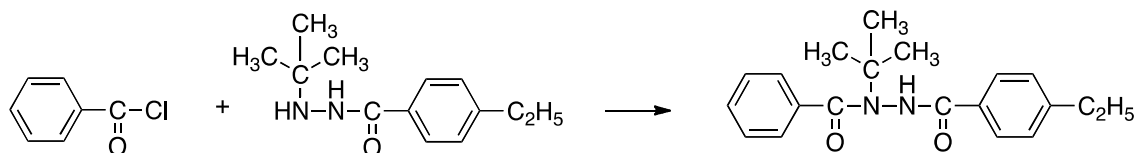
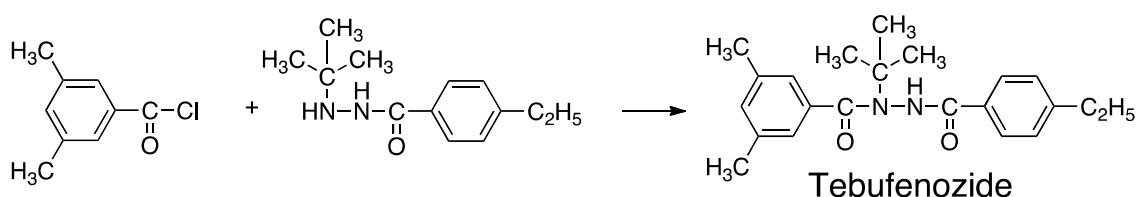


図 26 代表的なテルペン類

3.8 殺虫剤テブフェノジドおよびその誘導体の合成と殺虫活性の測定

3.8.1 目的

殺虫剤の中には、神経系や呼吸系に作用するもの以外に、昆虫に特異な生理機能である脱皮や変態を阻害するものがある。その中で、昆虫の脱皮ホルモン様の作用を示すジベンゾイルヒドラジン（あるいはジアシルヒドラジン）型の化合物が、チョウ目（鱗翅目）害虫に対する殺虫剤として実用されている。本実験では、その中の一つである tebufenozide を合成し、ハスモンヨトウに対する殺虫活性を調べることを目的とする。同時に無置換の benzoyl chloride を用いて tebufenozide の誘導体を合成し、ハスモンヨトウに対する殺虫活性を調べて、活性におよぼす置換基の効果について学ぶ。実験ペアの一人は tebufenozide、もう一人は無置換体を合成し、活性を測定して、考察は二人一組で行なう。



3.8.2 試薬類

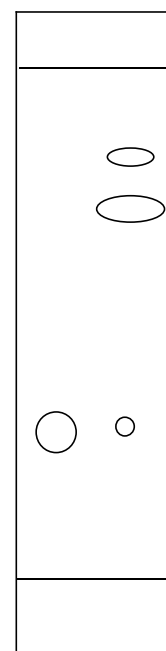
N-tert-Butyl-*N'*-(4-ethylbenzoyl)hydrazine (150 mg), 3,5-dimethylbenzoyl chloride あるいは benzoyl chloride, 2M NaOH, 2M HCl, 飽和 NaHCO₃, ヘキサン, 酢酸エチル, エタノール, TLC, 無水硫酸ナトリウム

3.8.3 合成方法

平底試験管に *N*-tert-butyl-*N'*-(4-ethylbenzoyl)hydrazine, 150 mg (0.68 mmol) を取り, 酢酸エチル 3 ml に溶解する。そこへ benzoyl chloride (105 mg, 0.086 ml; 0.75 mmol) あるいは 3,5-dimethylbenzoyl chloride

(127 mg, 0.111 ml; 0.75 mmol)を加えて約 15 分間攪拌する。反応を TLC で確認する。展開溶媒としてヘキサン・酢酸エチル 2:1 を用いる。十分に反応が進んでいれば、2M NaOH を 3 ml 加えてしばらく攪拌する。上澄み（酢酸エチル層）にキャピラリーを入れて一部を吸い上げ、TLC にスポットする（反応液は濃厚なので、スポットする量に注意する。特にキャピラリーが太い場合は、溶媒で希釈してからスポットするほうが良いかもしれない）。反応の進行を確認したのち、5 ml の酢酸エチルを加えて十分攪拌する。攪拌を止めて静置したのち、有機層（上澄み）をスポイトで吸い取り、50 ml 容三角フラスコに移す。水層を吸い込まないように注意する。残った水層に再度酢酸エチル 5 ml を加えて、同様に酢酸エチル層をスポイトで吸い上げ、先程の酢酸エチル層と合一する。この操作をもう一度繰り返し、約 15 ml の酢酸エチル溶液を得る。約 10 g の無水硫酸ナトリウムを加えたのち、綿ろ過をして 50 ml 容のナスフラスコ（あらかじめ風袋の重量を量っておく）に移す。三角フラスコに残った硫酸ナトリウムを 2-3ml の酢酸エチルで 2 度すすいだ後、洗液を綿ろ過して先程の酢酸エチル層と合一する。エバポレーターを用いて濃縮する。粗収量 190 mg (86%)。少量のエタノールを加えて、熱湯中で加熱して溶解する。この際、エタノールを加え過ぎないように注意する。葉包紙で巻いたコルク栓でフタをして翌日まで放置すると樹枝状の結晶が得られる。

上澄みをスポイトを用いて注意深く除去し、少量のヘキサン（冷却した方がよい）を加えて結晶を洗浄する。この結晶洗浄操作をもう一度繰り返し、フラスコごとデシケーターで乾燥したのち、融点の測定を行なう。文献値 194-195°C (tebufenozide) 214-215°C (無置換体) (Nakagawa et al. Steroids 65, 117-123, 2000)。再結晶で得られた標品を殺虫試験に用いる。



左 : 出発物質
右 : 反応液

3.8.4 殺虫試験

まず、tebufenozide の結晶を 3.5 mg (無置換誘導体の場合は 3.2 mg) 秤量し、小さな試験管 (9 mm × 60 mm) に入れる。そこへ、ピペットマンを用いてジメチルスルフォキシド(DMSO)200 μ l を加え、溶解して 50 mM の溶液を作成する。(秤量した化合物量に合わせて DMSO の量を調整して 50 mM の溶液を作成するほうが容易である。) つづいて、ピペットマンを用いて、50 mM の DMSO 溶液から 50 μ l を小試験管に移し、そこへ 450 μ l の DMSO を加える。この操作によって 1/10 の濃度、すなわち 5 mM の DMSO 溶液が調製できたことになる。同様の方法で、5 mM の溶液から順に 0.5 mM, 0.05 mM の溶液を調製する。

3 枚のシャーレに濾紙を敷いて、昆虫飼料（インセクタ）を約 1 cm の厚さに切って入れる。そこへふ化後約 10 日の第 4 令ハスモンヨトウを 10 頭づつ入れ、ハスモンヨトウの幼虫背板にそれぞれの DMSO 溶液を、1 μ l づつ塗布（局所投与）し、昆虫飼育室で飼育する。5-7 日間観察し、致死数を数える。インキュベータで飼育した場合、湿度が高くなりすぎて死亡する個体が増える。

3.8.5 参 考

- ① Tebufenozide の合成の中間体である *N*-tert-butyl-*N'*-(4-ethyl-benzoyl)- hydrazine は *N*-tert-butylhydrazine·HCl と 4-ethylbenzoyl chloride から合成されたが、なぜ先に 3,5-dimethylbenzoyl chloride と反応させてから、最後に 4-ethylbenzoyl chloride を後で添加しなかったかについて考えてみなさい。また、この反応では、HCl 塩から *N*-tert-butylhydrazine を遊離するために NaOH 等の水溶液が使われるが、なぜ benzoyl chloride は加水分解されずにアミドの形成に利用されるのか考えてみなさい。

- ② Tebufenozide は、昆虫の脱皮ホルモンである 20-hydroxyecdysone (20E)と同じ作用を示すとともに、チョウ目の昆虫に対して強い殺虫活性を示す。これまでの研究から、20E はその受容体である ecdysone receptor (EcR)に結合し、ultraspiracle(USP)というタンパク質とヘテロダイマーを形成して遺伝子の転写調節をすることが分かっている。ほとんどすべての昆虫において 20E が脱皮ホルモンとして使われていて、20E の効力は昆虫種間でそれほど変わらない。しかし、Tebufenozide をはじめとするジベンゾイルヒドラジン類は、チョウ目以外の昆虫、たとえばハエ目やコウチュウ目に対しては殺虫活性をほとんど示さないか、あったとしても非常に低い。このような選択性が現れる原因について考えてみなさい。

参考書

3.1. 一般操作

日本化学会編「第4版 実験化学講座 基本操作1」丸善, 1992 化学同人編集部編「実験を安全に行なうために」化学同人, 1989 化学同人編集部編「続・実験を安全に行なうために」化学同人, 1987 後藤俊夫ら監修「有機化学実験のてびき」化学同人, 1988 畑一夫ら著「基礎有機化学実験」丸善, 1968 グリッターら著, 原昭二訳「入門クロマトグラフィー」東京化学同人, 1988

3.2. (±)-1-フェニルエチルアミンの光学分割

日本化学会編「光学異性体の分離」化学総説6, 学会出版センター, 1989 原田 馨著「生命の起源」UP バイオロジー No. 21, 東京大学出版会, 1977 ガードナー著「自然界における左と右」紀伊国屋書店, 1992

3.3. 酸化反応による甘味剤サッカリンの合成

京都大学農学部農芸化学教室編「新改版 農芸化学実験書(増補)第二巻」産業図書, 1965 日本化学会編「第4版 実験化学講座 23 有機合成 V」丸善, 1991 栗原堅三著「味覚」UP バイオロジー No. 27, 東京大学出版会, 1978

3.4. 置換反応による植物生長調節剤 2,4-D の合成

日本化学会編「第4版 実験化学講座 20 有機合成 II」丸善, 1992 内山正昭ら著「農薬学概論」, 朝倉書店, 1982 倉石晋著「植物ホルモン」UP バイオロジー No. 11, 東京大学出版会, 1988

3.5. Wittig 反応による E-, Z-スチルベンの合成

山本嘉則編著「有機化学基礎の基礎-100 のコンセプト」化学同人, 1997
D. W. Mayo, R. M. Pike and S. S. Butcher, "Microscale Organic Laboratory", 2nd edition, p. 220-232, John Wiley & Sons, New York, 1986

3.6. Diels-Alder 反応による 2,3-ジメチルアントラキノンの合成

山本嘉則編著「有機化学基礎の基礎-100 のコンセプト」化学同人, 1997
E. C. Horning, "Organic Syntheses", Col. Vol. III, p. 310, John Wiley & Sons, New York, 1955

3.7. 植物に含まれる抗菌物質の単離と構造決定

後藤俊夫ら監修「有機化学実験のてびき 2」化学同人, 1989
シルバースタイン著, 荒木ら訳「有機化合物のスペクトルによる同定法」東京化学同人, 1992
深見順一ら編「農薬実験法2, 殺菌剤編」ソフトサイエンス, 1981
吉田精一ら著「高等植物の二次代謝」UP バイオロジーNo. 28, 東京大学出版会, 1978
ロバーツ著, 安藤訳「セレンディピティ」化学同人, 1993