

実習レポート 天然物化学教室

10191043 鈴木健一

実験日：2019/5/29 ～ 2019/6/3

共同実験者：白井孝平

第 I 部

Berberine の単離とその化学

目的

著名な生薬から重要薬物を単離するために必要とする基礎技術及び分光学的手法、化学的手法による構造解析に習熟する。

1 日目 黄柏より berberine の単離 (1)

実験方法

1. 黄柏を 2L ナスフラスコに入れる
2. メタノールを加え 75℃で 1 時間還流する。
3. 40～50℃に冷まして綿栓濾過を行う
4. エバポレーターで 200mL に濃縮する。この時湯浴の温度は 40℃程度にする。
5. 水を 500mL 加えて一日放置する。

結果

- 黄柏にメタノールを加えて還流すると液の色が黄色く変化した。

2 日目 黄柏より berberine の単離 (2)

実験方法

1. 昨晚放置した黄柏の濾液の不溶物を綿栓濾過で取り除く。
2. 再度ひだ折りろ紙を用いて濾過する
3. エバポレーターで 500mL まで濃縮して濾過する。

4. 15% の塩酸を 100mL 添加する。
5. 氷冷して結晶化する。
6. 粗結晶をプフナーロートで濾取する。
7. 冷アセトンで十分洗い、湯浴を用いて水に溶かす。
8. 濾液に少量の塩酸を加えて再び結晶化させる。
9. プフナーロートで濾取し、洗浄後にでしけーターで乾燥する。
10. 融点と重量を測定する。

結果

- 重量：2.47 g
- 分解点：165 °C (文献値：204 °C)
- 融点を測定して結晶が分解すると色が赤褐色に変化した。
- はじめに氷浴しながら塩酸を加えても全く析出物がなかったので、再び塩酸を加えてスパーテルで内壁を激しくこすると黄色い沈殿が発生した。これを濾過すると黄色い粗結晶が得られた。
- 再結晶すると結晶が水を吸って大きくなったのでろ紙で水を十分に取り除いてから乾燥した。

考察：今回の結晶化で塩酸を用いた理由

溶液内には様々なイオンが溶けているが、塩酸を加えることで陰イオンが塩化物イオンに統一されるので、berberine と塩化物イオンの溶解度積が限界量を超えて berberine chloride の塩がより多く析出する。

3 日目 berberine の dl-canadine への還元

実験方法

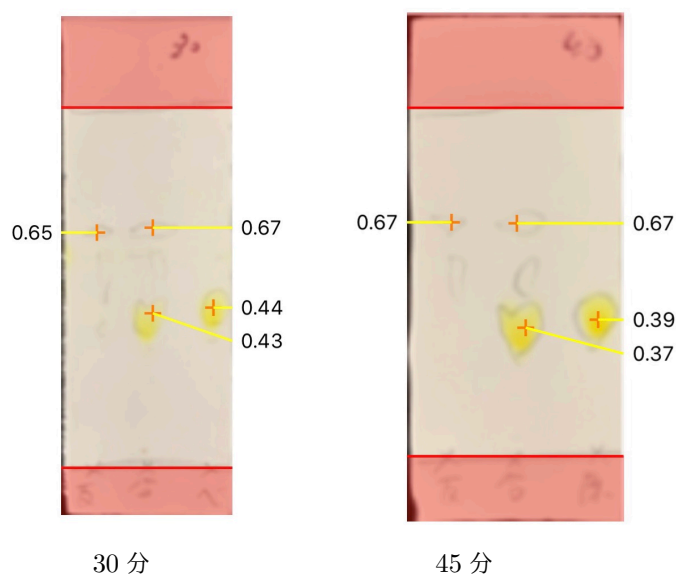
1. 3 g の berberine chloride を 200mL の三角フラスコにとり、60mL のメタノールを加えて水浴上で 45 °C 程度に加熱して溶解させる。
2. 常温に戻したら 1.5g の NaBH_4 を 5 分以上分けてゆっくりと加えて、1 時間静置する。
3. 反応の終結は TLC で確認する。原料の消失を確認したら水 30mL を加えさらに 30 分静置する。
4. 結晶を濾取して少量のメタノールで洗った後、クロロホルムに溶かし、不純物を濾去する。
5. 濾液を濃縮乾固し、残渣を 5~6mL のクロロホルムに水浴上で加熱しながら溶かし、60mL のメタノールを加え結晶を析出させる。
6. 濾取、乾燥したのちに融点と重量を求める。

結果

- berberine chloride にメタノールを加えると黄色い溶液となった。
- その後白色結晶の NaBH_4 を 1.50 g 加えると大量の泡と熱が生じた。一度溶液が黒く変化したのが、下に白い沈殿が発生して溶液の色は黄色に戻った。

- 最終的には明るいレモン色の結晶が得られたが、本来の結晶の色は白らしい。
- 収量：0.78 g
- 融点：147～149 °C

TLC



考察

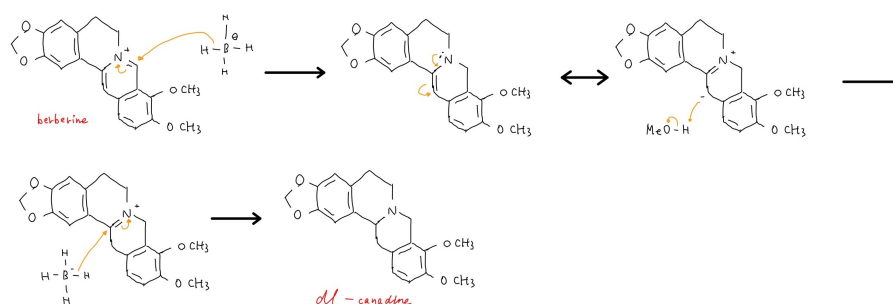
berberine は dl-canadine に比べて共役系が長いため、黄色い蛍光を発していると考えられる。

問題

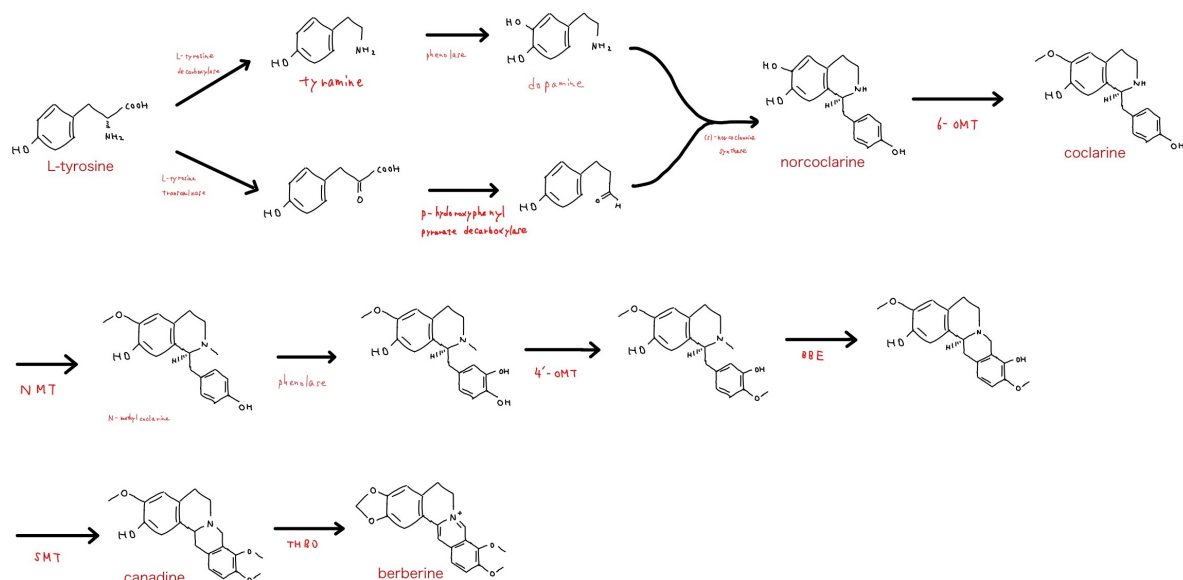
問題 1

- (1) Berberine の NaBH_4 による還元のプロセスを考察せよ
- (2) Berberine, canadine の生合成について考察せよ

(1) Berberine は NaBH_4 によって以下のように還元される



(2) berberine は以下のように生合成される。全 13 段階のうち 2 段階は p450 が触媒である。



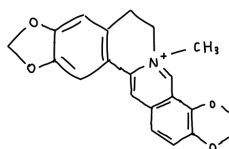
問題 2

硫酸ジメチルは典型的なメチル化剤の一つである。実習書 1-18 における反応条件下で *dl* - canadine のなかで求電子的なメチル化を受けるのはどこか。

dl - canadine の窒素原子の非共有電子対が求電子的なメチル化を受ける。

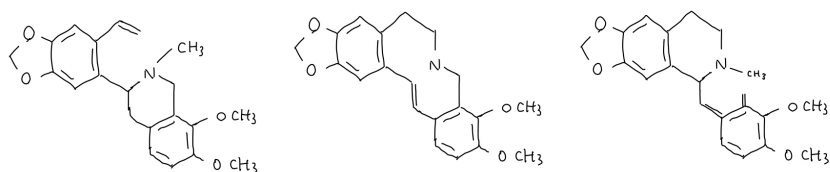
問題 3

dl - canadine のメチル化物はクロロホルムに難溶であるため、クロロホルム中で結晶として単離された。すなわち、水には溶け易い性質を持っており、メチル化物は塩の形になっているものと思われる。このメチル化物の構造を推定しなさい。



問題 4

このメチル化物をアルカリ性条件下で加熱すると、メチル化物を構成していたカウンターイオンの硫酸イオンがカリウムイオンと会合して脱離し、また同時に塩基がプロトンを奪う。ここでメチル化物はイオン化していない状態へ戻るが、ある結合が切れなければならない。結合が切れる可能性は原料に戻る場合を除いて 3 通り考えられる。その可能性を示しなさい。



問題 5

^{13}C の天然存在比率を理化学辞典などで調べなさい。*dl*-canadine の $M^+ + 1$, M^+ , $M^+ - 1$ がどんな原子組成から成り立っているか推測しなさい。

天然存在比

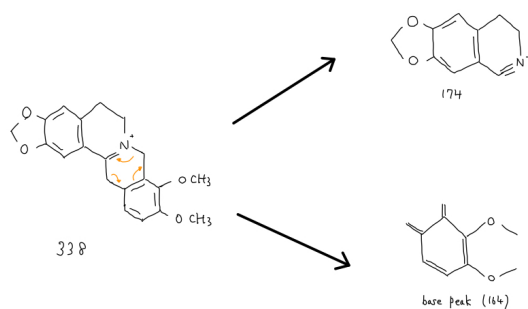
$$^{12}\text{C} : ^{13}\text{C} = 98.93\% : 1.07\%$$

M^+ が berberine 分子イオンであり、 $M^+ + 1$ はそのうちの炭素 1 つが ^{13}C である分子イオンである。 $M^+ - 1$ は脱水素ラジカルを起こした分子イオンである。このとき脱水素ラジカルを起こす可能性が高いのは窒素原子の隣の炭素原子である。

問題 6

dl-canadine の $M^+ + 1$ のフラグメントピークは、どのような分子構造か。*dl*-canadine の Mass スペクトルにおける base peak 164 はどのような分子構造か。

分子量 174 のピークがあることから、以下のように分子量 338 の $M^+ - 1$ フラグメントが分離して base peak と分子量 174 のフラグメントが生じたと考えられる。



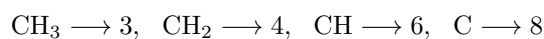
問題 7

図 2-1 に示した変換物の Mass スペクトルから変換物の分子量を推定しなさい。

分子イオンピークが 353 にあり、メチルラジカルの脱離により 338 のピークを生じることから、 $M^+ - 1$ フラグメントにメチル基が 1 つ導入されたと考えられる。したがって変換物の分子量は 353 と考えられる。

問題 8

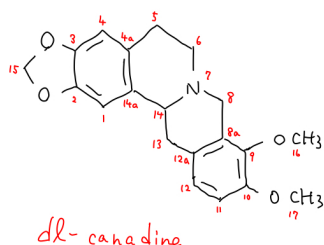
図 2-3 に示した変換物のコンプリートと DEPT のチャートを解析し、 CH_3 , CH_2 , CH , C の数を数えなさい。



問題 9

dl-canadine と変換物の ^{13}C -NMR スペクトルを比較して、大きく変化した点を指摘しなさい。

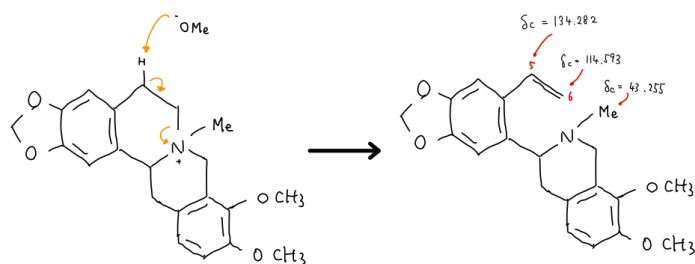
以下に示す *dl*-canadine の 5 番と 6 番の炭素に相当するピークが消失している。その代わりに新たなピーク (43.255 , 114.593 , 134.282) が現れている。



問題 10

問題 4 で考えた 3 通り仮想生成物から問題 9 で指摘した点を最もよく説明するものの構造を示し、その理由を説明せよ。また、メチル化物から変換物が生成する段階は著名な人名反応であるが、その反応名を書きなさい。

問 9 で指摘した点を最も説明できるのは以下に示す反応経路である。この条件であれば、5 番と 6 番の炭素のピークが消失し、代わりに $\delta_c = 114.593$, 134.282 が出現したことを説明できる。 $\delta_c = 43.255$ は N-メチル化によるものである。また、このように 4 級アンモニウム塩からプロトンが脱離してアミンとアルケンを生じる反応をホフマン脱離という。



第Ⅱ部

Curcumin の単離および生合成酵素を用いた異種生産

目的

生合成研究の一例として Curcumin 生合成酵素の酵素化学的研究法的一端に触れる。

4 日目

実験方法

秋ウコンからクルクミンの単離・精製

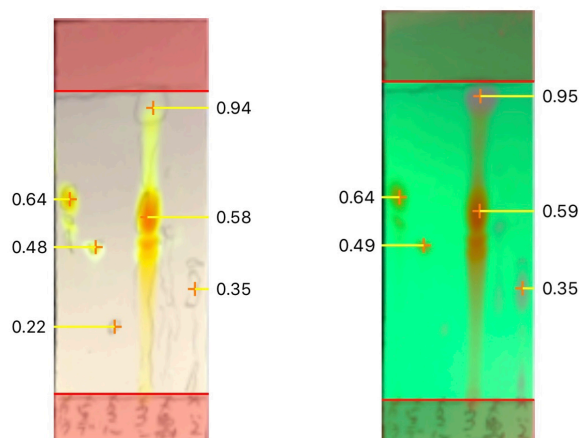
1. 20g の秋ウコン粉末をいれた 100mL の三角フラスコに 50mL のジクロロメタンを入れ、60 分静置する。得られた抽出液をひだ折りろ紙で濾過し、濾液をエバポレーターで濃縮する。
2. 得られたオイルに対して 20mL のヘキサンを加えて析出した固体を桐山ロートで濾取する。
3. ジクロロメタンに溶解させて TLC で分析する。

大腸菌を用いたビスデメトキシクルクミンの生産

ネガティブコントロールとクルクミン生産大腸菌の培養液 (10mL) をそれぞれ遠心チューブに入れ、6M HCl で pH を約 3 としたあと、酢酸エチルで抽出 (10mL × 2) する。HCl を加える際には発泡がともなうため、様子を見ながら徐々に加える。遠心して酢酸エチル層と水層を分離したあと、酢酸エチル層を取り、Na₂SO₄ で乾燥後、エバポレーターで濃縮乾固する。残渣を少量のジクロロメタンに溶解し、TLC 上にスポットして、ネガティブコントロール、標品と比較することで、ビスデメトキシクルクミンの生産を確認する。

結果

TLC



問題

問題 1

Curcumin の生物活性について述べなさい。また、curcumin と類似の過程により生合成されると予想される天然物を示しなさい。

Curcumin は以下のような生物活性を持つ。

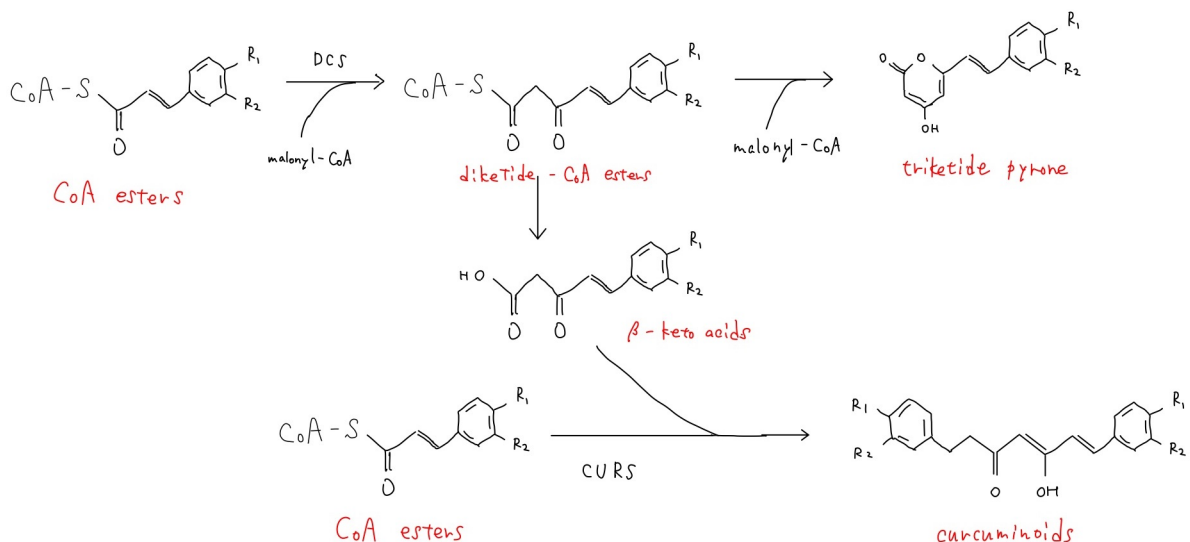
- アミロイド β 凝集抑制
- 抗炎症
- 抗がん
- 脂質代謝改善
- 抗酸化

curcumin と類似の過程により生合成されると予想される天然物はショウガに含まれる成分であるジンゲロンやショウガオールである。

問題 2

CUS の副生成物として、360 nm に極大吸収を示す化合物も生産される。これは実習書の序で述べた CHS の副生成物でもあり、マロニル CoA 2 分子の縮合の後に環化を経て生成する。どんな化合物が考えられるか考察しなさい。

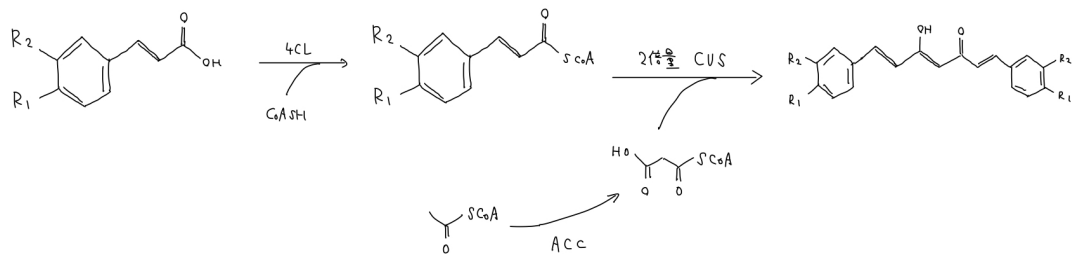
以下のようにして curcuminoids と副生成物の triketide pyrone が生成する。



問題 3

ウコンからの抽出・精製と異種発現系によって得られたクルクミノイドについて相違を考察するとともに、大腸菌などの異種発現系を用いた物質生産の利点と欠点を述べなさい。

大腸菌は以下のようにして curcuminoids を合成する。



問題2のクルクミノイド合成と比較すると、ウコンでの合成経路では副生成物が生じるが大腸菌では副生成物が生じることがわかる。異種発現系では目的の生成物を特異的に合成することができるという利点がある。しかし、大腸菌では原料が合成できないため、原料を与える必要があるという欠点がある。