

# α-メチレン基を有する簡単なラクトン類の合成とその微生物活性

大阪職業能力開発短期大学校 登 成 健之介

Synthesis of Simple α-Methylene Lactones and Their Antibacterial Properties

Kennosuke TONARI

## 要約

抗菌性が期待される α 位にメチレン基を有する γ-, δ-ラクトン及び類縁体を合成し、その抗菌性をそば粉より分離したグラム陽性、陰性菌等に対して調べた。

その結果、六員環ラクトンである α-Methylene-δ-valerolactone が従来より知られるツリパリン A (α-Methylene-γ-butyrolactone) や、食品添加物として知られるソルビン酸より効果があることがペーパーデスク法の阻止円の大きさより判明した。

また、これら物質の抗菌機構として、α-メチレンシクロペンタノン(12)を例にとり、本物質と各種アミノ酸との反応をペーパークロマトグラフィーで調べた。

その結果、(12)はリジン、システイン等のアミノ酸と新生するスポット (ミカエル型の付加生成物と推定)を生じるので、おそらく、これら α, β-不飽和カルボニル化合物は一般に蛋白質、酵素等の活性中心にみられる -NH<sub>2</sub>, -SH 基とミカエル型の付加物を形成すると考えられ、この事がこれら酵素類の不活性化につながり抗菌作用が現れると推定される。

## I 緒言

一般にカルボニル基の α 位にメチレン基 (>CH<sub>2</sub>) を有する化合物は生理活性的に興味あるものが多い。

例えば、チュウリップが生産する微生物に対する自己防御物質の一つでグラム陽性菌に対して有効であるとされるツリパリン A 他<sup>(1),(2)</sup>、抗菌、抗腫瘍性を有する、キク科、ヨモギ科植物のセスキテルペン類<sup>(3)</sup>や、放線菌の産生する物質等<sup>(4)</sup>知られ、いずれもラクトン、ケ

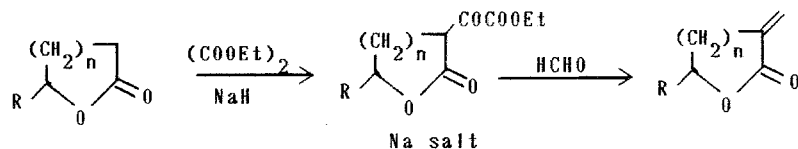
トンの α 位にメチレン基を有している。

筆者は入手容易な γ-, δ-ラクトン類、シクロケトンのカルボニル基の α 位にメチレン基を導入した化合物を合成し、その微生物活性について報告する。

## II 合成

### 1. メチレンラクトン類の合成

- α-Methylene-γ-butyrolactone (3)  
(Tulipalin A)<sup>(1),(2)</sup>



- |           |                     |     |   |
|-----------|---------------------|-----|---|
| n=1, R=H  | γ-Butyrolactone (1) | (2) | (3) α-Methylene-γ-butyrolactone (Tulipalin A) |
| n=1, R=Me | γ-Valerolactone (4) | (5) | (6) α-Methylene-γ-valerolactone               |
| n=2, R=H  | δ-Valerolactone (7) | (8) | (9) α-Methylene-δ-valerolactone               |

図-1 α-メチレンラクトンの合成経路

これらラクトン類の合成は図-1 に示したルートで合成されるが、(3)については当初、エーテル中の水素化ナトリウムに、 $\gamma$ -Butyrolactone (1)と蓚酸エチルを滴下する方法を行っていたがこの方法では急に反応しはじめ、激しくエーテルが還流し、制御できなくなる等危険を伴うものであった。このため、無水エタノール中に水素化ナトリウムを徐々に加え、エタノール中のナトリウムエトキンドとした後、(1)と蓚酸エチルを滴下、室温下で反応させ、生成した白色沈澱(2)を濾取し、次にこれをテトラヒドロフラン (THF) 中に分散後、室温下にホルマリン溶液を加える事により、ワンポットで目的物(3)が得られることを見いだした。また、(3)を減圧蒸留下に得ようとしたが、熱による重合が激

•  $\alpha$ -Methylene- $\delta$ -valerolactone (9)<sup>(1)</sup>

本物質も(3)と同様の方法で合成できるが、中間体の蓚酸エチルとの反応物(8)は黄色の濁り液であるため、エタノール留去後の残留物をn-ヘキサンで洗浄後、ホルマリンと処理して得たが、本物質はGC-MSではRt=3.1分、112(M<sup>+</sup>)、61.4%とRt=3.81分、128(M<sup>+</sup>)、26.2%と混合物であった。

従って、シリカゲルカラムでこれを精製し、(9)を96%以上含むフラクションを得た。本フラクションをNMR分析すると4.3および5.1 ppmにメチレン基の吸収が見られ、IRでは1620 cm<sup>-1</sup>にカルボニル基とシス共役するメチレン基の吸収が観測された。

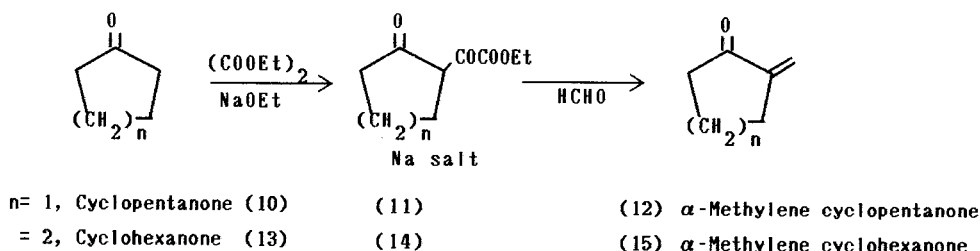


図-2  $\alpha$ -メチレンシクロケトンの合成経路

しく、ほとんど目的物は得られない状況であった。そこで上記反応後の反応液をセライト濾過し、低温下に溶媒を留去させ、塩化メチレンで抽出することにより目的物が純度よく得られる事がわかった。

GC-MSの分析ではRt=1.64分に98(M<sup>+</sup>)が100%純度として観測され、NMRでは5.7および6.2 ppmにメチレン基による特徴的な吸収が見られる。また、IRにおいて、1660 cm<sup>-1</sup>にカルボニル基とシス共役したメチレン基の吸収が見られる。

•  $\alpha$ -Methylene- $\gamma$ -valerolactone (6)<sup>(2)</sup>

本物質も(3)と同様の方法で合成される。

即ち、 $\gamma$ -Valerolactone (4)と蓚酸エチルとの反応生成物(5)をホルマリンと処理することにより目的物(6)を得た。

GC-MSではRt=2.2分に112(M<sup>+</sup>)が98.8%純度で観察され、NMRより1.43 ppmメチル基のダブルット、5.6および6.1 ppmにメチレン基の吸収がみられる。IRにおいて1660 cm<sup>-1</sup>にメチレン基の特徴的な吸収がみられる。

2.  $\alpha$ -メチレンシクロケトンの合成

•  $\alpha$ -Methylene cyclopentanone (12)<sup>(1),(4)</sup>

本物質は図-2によるルートで合成されるが、基本的にはラクトン類の合成と変わらない。

即ち、エタノール中の水素化ナトリウムでナトリウムエトキンドとし、Cyclopentanone (10)と蓚酸エチルを室温下に反応させ、生成した黄色沈澱物(11)を濾別し、THFに懸濁後、低温下でホルマリンと反応させ、溶媒留去して目的物(12)を得た。GC-MS分析ではRt=1.1分に96(M<sup>+</sup>)が90%純度で得られた。NMRでは5.2および5.8 ppmにメチレン基の吸収が見られ、IRでは1640 cm<sup>-1</sup>にシス共役したメチレンの吸収が見られる。

•  $\alpha$ -Methylene cyclohexanone (15)<sup>(1)</sup>

(12)の場合と同様に行った。中間体の蓚酸エチルとの反応物(14)は黄色濁り液で、(9)の場合と同様、減圧下にエタノールを留去、得られた黄色アメ状物をn-ヘキサンで洗浄後、THFを加え、ホルマリンと反応させ、反応液を低温下で処理したが、目的物(15)を優位に含むものは得られなかった。即ち、GC-MS分析ではRt=

1.83分、110(M<sup>+</sup>)、17%と Rt=7.85分、220(M<sup>+</sup>)、80%との混合物であった。文献<sup>(1)</sup>のような結果(87%収率)は得られず二量体と思われるものが主であるため、以下の精製は実施しなかった。

### III 微生物試験

以上合成した α-メチレン化合物が食品の品質保持に効果があるか検討すべく、食品(そば粉)より分離したグラム陽性菌および陰性菌に対してその抗菌性を調べた。

尚、グラム陽性菌は標準寒天培地に0.3%フェネチルアルコールを添加して生育してくる菌群とし、グラム陰性菌はCVT培地で生育してくる菌群とした<sup>(5)</sup>。

試験方法は今回得た各化合物をペパーデスクに吸着させ、上記方法で得たグラム+、グラム-菌に対してその阻止円の大きさを比較するペパーデスク法で

行った。その結果を表-1に示す。

### IV α-メチレン化合物の抗菌機構の推定

α-メチレン化合物として α-Methylene cyclopentanone(12)を選び、これを希アルカリ下において各種アミノ酸と反応させ、反応生成物をペーパークロマトグラフィーにて分析し、新生するスポットが見られるアミノ酸を見いだした。それらはリジン、システイン他、ヒスチジン、トリプトファンで、いずれも塩基性の窒素を含有したアミノ酸あるいは反応性の硫黄を含んだアミノ酸であった。

これらアミノ酸はおそらく、α-Methylenecyclopentanone(12)のような α、β-不飽和カルボニル化合物と図-3に示すようなミカエル型の反応生成物を生じると考えられる。

このような事から、今回合成した α、β-不飽和カル

表-1 α-メチレンラクトンおよび関連物質のそば粉中の細菌に対する抗菌活性

	グラム+	グラム-	一般生菌
Sorbic acid (SBA)	7.0 (mm)	6.3 (mm)	6.0 (mm)
Cinnamic acid (CIA)	9.0	6.4	6.5
α-Methylene-γ-butyrolactone (3)	6.4	6.0	6.0
α-Methylene-γ-valerolactone (6)	6.7	6.0	6.0
Itaconic anhydride (ITA)	7.7	7.7	7.0
α-Methylene-δ-valerolactone (9)	10.0	23.6	14.5
α-Methylene cyclopentanone (15)	6.0	6.3	6.5

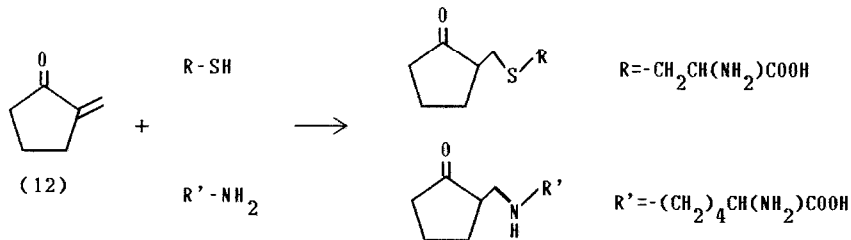


図-3 α-メチレンシクロペンタノン(12)とアミノ酸(システイン、リジン)との予想反応生成物

ポニル型化合物は一般に蛋白質、酵素等の活性中心にみられる $-NH_2$ 、 $-SH$ 基とミカエル型の付加物を形成すると考えられ、この事がこれら酵素類の不活性化につながり抗菌作用が現れると推定される。

## V 実験の部

GS-MSはHewlett Packard 5890 Q-pole スペクトルメーター(カラム:methylsilicone gum 10 m)を使用した。IRはIR-400島津製作所製を、NMRはJNM-MY60日本電子製を用いた。

### $\alpha$ -Methylene- $\gamma$ -butyrolactone (Tulipalin A)(3)

無水エタノール50 mlにNaH (0.07 mol, 2.8 g)を少量ずつ加えEtONaを生成させる。 $\gamma$ -Butyrolactone (1)(0.07 mol, 6 g)と蓚酸エチル(0.084 mol, 12.3 g)を氷冷下に滴下、室温で反応させると、乳白色の沈澱(2)を得る。これを吸引濾過して集め、エーテルで洗浄後、THF40 mlに懸濁させ、ホルマリン17 ml(ホルムアルデヒドとして0.21 mol)を滴下、室温下に20分反応させ、白色スラリー状の反応液を得る。これをセライト上で吸引濾過し、濾液より溶媒を留去後、塩化メチレンで抽出し、抽出液を飽和重炭酸カリ溶液で洗浄、芒硝で乾燥させる。溶媒留去すると無色透明な(3)を5.3 gを得る。

GC-MS Rt=1.64 min. (100%) m/z: 98 ( $M^+$ ) 68, 53. IR  $\nu_{max}$  (neat)  $cm^{-1}$ : 2900, 1750, 1710, 1660, 1360, 1260, 1110, 1020. NMR ( $CDCl_3$ )  $\delta$ : 2.8-3.2 (2H, m), 4.2-4.6 (2H, t, J=8.5 Hz), 5.7 (H, t, J=3.5 Hz), 6.2 (H, t, J=3.5 Hz)

### $\alpha$ -Methylene- $\gamma$ -valerolactone (6)

NaH (0.07 mol, 2.8 g)とEtOH (50 ml)よりEtONa (0.07 mol)とし、これに $\gamma$ -Valerolactone (4) (0.07 mol, 7.0 g)と蓚酸エチル(0.084 mol, 12.3 g)を氷冷下に滴下、室温で反応させると、淡黄色の沈澱(5)を得る。以下(3)の場合と同様の操作を行い、6.5 gの(6)を得る。

GC-MS Rt=2.2 min. (98.8%) m/z: 112( $M^+$ ), 97, 83, 68, 53. IR  $\nu_{max}$  (neat)  $cm^{-1}$ : 2900, 1740, 1660, 1380, 1330, 1250, 1030. NMR ( $CDCl_3$ )  $\delta$ : 1.43 (3H, d, J=7 Hz), 3.6-3.8 (2H, m), 4.5-4.8 (H, m), 5.6 (H, s), 6.1 (H, s)

### $\alpha$ -Methylene- $\delta$ -valerolactone (9)

NaH (0.07 mol, 2.8 g)とEtOH (50 ml)よりEtONa (0.07 mol)とし、これに $\delta$ -Valerolactone (7) (0.07 mol, 7.0 g)と蓚酸エチル(0.084 mol, 12.3 g)

を氷冷下に滴下、室温で反応させると、淡黄色の濁り液となる。EtOHを減圧留去して得られる残留物(8)にヘキサン、エーテルを加えて洗浄した後、THF 40 mlを入れて分散させ、氷冷下にホルマリン17 mlを加えて反応させる。生成したスラリー状物をセライト上で吸引濾過し、濾液より溶媒を留去する。得られた残留物を飽和重炭酸カリで洗浄後、塩化メチレンで抽出し、芒硝で乾燥後、溶媒留去して目的物とするが、本物質はGC-MSによると、混合物(61.4%の(9)含有)ゆえ、シリカゲルクロマトグラフィ(ether:hexane=1:1で溶出)で精製し、目的物(9)を96%以上含むフラクションを得た。

GC-MS Rt=3.10 min. (97.8%) m/z: 112 ( $M^+$ ), 84, 82, 67, 54. IR  $\nu_{max}$  (neat)  $cm^{-1}$ : 2850, 1710, 1620, 1400, 1290, 1140, 1070, 1020. NMR ( $CDCl_3$ )  $\delta$ : 0.5-0.9 (2H, t, J=5.3 Hz), 1.2-1.7 (2H, m), 3.0-3.3 (2H, t, J=5.3 Hz), 4.3 (H, s), 5.1 (H, s).

### $\alpha$ -Methylene cyclopentanone (12)

NaH (0.07 mol, 2.8 g)とEtOH (50 ml)よりEtONa (0.07 mol)とし、これにCyclopentanone (10) (0.07 mol, 5.9 g)と蓚酸エチル(0.084 mol, 12.3 g)を氷冷下に滴下、室温で反応させると、淡黄色の沈澱(11)を生じる。沈澱物をエーテル、*n*-ヘキサンで洗浄後、THF 30 mlに懸濁させ、 $-5^\circ C$ でホルマリン17 mlを滴下、20分反応させ、反応液をセライト濾過する。濾液を重曹、飽和食塩水で洗浄後、芒硝で乾燥、溶媒留去して目的物(12)を得る。

GC-MS Rt=1.1 min. (90%) m/z: 96 ( $M^+$ ), 81, 67, 65, 53. IR  $\nu_{max}$  (neat)  $cm^{-1}$ : 2900, 1720, 1640, 1380, 1160, 930. NMR ( $CCl_4$ )  $\delta$ : 1.9-2.4 (4H, m), 2.5-2.8 (2H, m), 5.2 (H, s), 5.8 (H, s)

### $\alpha$ -Methylene cyclohexanone (13)

NaH (0.07 mol, 2.8 g)とEtOH (50 ml)よりEtONa (0.07 mol)とし、これにCyclohexanone(13) (0.07 mol, 6.9 g)と蓚酸エチル(0.084 mol, 12.3 g)を氷冷下に滴下、室温で反応させると、黄色の濁り液を得る。以下、(9)の場合と同様に処理して、洗浄した残留物を得、これをTHF 40 mlに懸濁させ、 $-5 \sim -10^\circ C$ でホルマリン17 mlを滴下、5分反応後、反応物を冷却したセライトで濾過し、冷重曹水、飽和食塩水で洗浄する。芒硝で乾燥、溶媒留去して目的物とするが、GC-MS分析結果、二量体と思われるものを主に含むものであり、以下の精製等の検討は実施しなかった。GC-MS Rt=1.83 min. (17%) m/z: 110 ( $M^+$ ), 82, 67, 54. Rt=7.85 min. (80%) m/z: 220, 203, 191, 174, 161,

122, 110, 82, 67, 55.

### Itaconic anhydride (ITA)

試薬無水イタコン酸 1 級(和光純薬) mp. 66-70°C

### Sorbic acid (SBA)

試薬ソルビン酸特級(和光純薬) mp. 132-6°C

### Cinnamic acid (CIA)

試薬 trans ケイヒ酸特級(和光純薬) mp. 133-6°C

### 微生物試験

1. 市販そば粉10 g を生理食塩水100 ml に分散させたものを試料原液とする。この0.1 ml を標準寒天培地(一般生菌用)、標準寒天培地+0.3%フェネチルアルコール(グラム陽性菌用、フェネチルアルコールは培地滅菌後に添加する)およびCVT寒天培地(グラム陰性用)の表面に塗布し、標準寒天培地使用のものは36°C、48時間、CVT培地のは25°C、72時間培養して試験菌を得る。
2. 各検体の5%アセトン溶液(0.25 g/5 ml acetone)を作成し、その5 ul を市販ペーパーデスクに吸着風乾させておく。
3. 上記生育させた各試験菌のコロニーを5白菌耳とり、生理食塩水5 ml に懸濁させ、各0.1 ml を標準寒天培地の表面に塗布した後、2. で調整した各検体のデスクを置き36°C、24時間、培養後の阻止円の大きさを測る。

### $\alpha$ -Cyclopentanone (I2)とアミノ酸との反応

各種アミノ酸(Lys., Arg., Cys., Met., Ser., Gly., Ala., His., Trp., Tyr.) の5%NaHCO<sub>3</sub>水溶液に $\alpha$ -Cyclopentanone(I2)数滴を混合し、35°C、1時間放置後、酢エチを加えよく振り、酢エチ層を原料アミノ酸と共にペーパークロマトグラフィー(No. 50濾紙, n-BuOH:AcOH:H<sub>2</sub>O=4:1:2)で分析した。その結果、原料アミノ酸以外のスポット(おそらく付加物)が見られたのはLys., Cys., His., Trp. であった。

## VI まとめ

$\alpha$ 位にメチレン基を有するラクトン類およびシクロケトンを合成し、その抗菌性を調べた。

1.  $\alpha$ -メチレン- $\delta$ -バレロラクトンの抗菌効果は従来より知られているツリパリリンAや食品添加物のソルビン酸より優れている。
2.  $\alpha$ -メチレン基を有するカルボニル化合物の抗菌効果に言及し、活性なアミノ酸の基とこれらカルボニル化合物が反応することより、酵素等の活性なアミノ酸残基が不活性化して抗菌性が発揮されると推測した。

### [謝辞]

本研究は平成6年度大阪職業能力開発短期大学校、産業化学科の卒業論文の一テーマとしてとりあげたもので、同年卒業生の太谷岳史君の多大の協力を得たのでここに深謝いたします。

### [参考文献]

- (1) G. M. Ksanler, J. E. McMurphy and M. Johnson, J. Org. Chem. vol. 44, 1180-5 p (1977)
- (2) A. Tanaka and K. Yamanishi, Agric. Biol. Chem. vol. 42, 1582-8 p (1978)
- (3) G. H. N. Towers and J. C. Mitchell, Phytochemistry 15, 1573-80 p (1976)
- (4) K. Tonari, K. Machiya, I. Itimoto and H. Ueda, Agric Biol. Chem. 45, (1), 295-300 p (1981)
- (5) 春田三佐夫、細貝裕太郎、宇田川俊一編、目でみる食品衛生検査法(中央法規出版) 67 p