2. (i) Heterocaryosis has been studied with 8 amino acid deficient mutant strains. In all possible combinations of (lys⁻+leu⁻), (lys⁻+his⁻), and (his⁻+leu⁻), except certain combinations (3FSR his⁻+14S leu⁻) and (3FSR his⁻+17S leu⁻), the prototrophic heterocaryons, able to grow on minimal media, were formed.

(ii) Genetic tests for allelism, between 2 strains with similar requirements, have also been carried out. Between 2 leucineless mutants and between 2 histidineless mutants seemed to be allelic, because no positive growth response differing from the controls were obtained, however, among 4 lysineless mutants, both allelic (6 st lys⁻+1 st lys⁻) and non-allelic (6 st lys⁻, 2 st lys⁻, 20S lys⁻) strains were found.

3. The higher ratios of prototrophic heterocaryon formation were obtained upon those media favoring anastomosis, i. e., lower concentrations of natural media such as Koji- and Malt-extracts.

4. The segregation ratios of prototrophic heterocaryons were almost constant through 4 generations of pedigree cultures.

5. For the stability of heterocaryon, the lower concentrations of both natural and synthetic media, especially the latter, have been found to be favorable, being more favorable.

6. The phenotype of heterocaryons, as regards to sporulation, color of colony and growth-rate etc., have exhibited colonies intermediate of both parents or similar to either parent. Effects resembling heterocaryotic vigor were also recognized in certain morphological characteristics.

赤外線分光分析による薄荷異性体の研究

(薄荷の研究 第2報)

上田 博夫, 三井 哲夫 (京都大学農学部農産製造学研究室)

昭和 29 年 8 月 4 日 受理

Infra-red Absorption Character of Menthol-isomers. (Studies on the Peppermint. Part 2)

By Hiroo UEDA and Tetsuo MITSUI (Laboratory of Technological Chemistry
of Agricultural Products, Dept. of Agr., Kyoto Univ.)

薄荷腦の主成分である menthol は 3 個の不斉炭素原子を有しているから, menthol, neomenthol, isomenthol, neoisomenthol の 4 種の立体異性体とその各に 3 通りの光学異性体が存在する事は既に知られている。薄荷油から天然薄荷腦を精製する際, 異性体間の転移が品質低下の原因となり, 又近時工業化されつつある合成薄荷に於ても各異性体が必然的に混在して来る可能性がある。

これらの製造工程に於て, 異性体を定性定量的に分析する事は極めて重要な問題であるが, 適当な分析法は未だ見出されていない。著者等は *l*-menthol を原料として *d*-neomenthol, *d*-isomenthol, *d*-neoisomenthol を合成し, 赤外線吸収スペクトルを測定した結果各異性体特有の吸収曲線を得, これより Key band を決定した。これは薄荷異性体分析の可能性を示唆するものであると考えるので, ここに報告する。

Menthol 異性体の立体配置に関しては READ 等⁽¹⁾の研究があるが, 更にシクロヘキサン環が椅子型構造をとり, 且つ反転現象を示す⁽²⁾ことの最近の知見を導入すれば Fig. 1 のような立体構造が考えられる。

一般に赤外線分光分析に於て, 光学異性体は固体スペクトルに就ては, D- 又は L- 体と, DL- 体とでは非常に異なる吸収曲線を示すが, 稀薄溶液でとれば, スペクトルは完全に一致する事が知られているから⁽³⁾, 12 種の menthol 異性体の中, 4 種の立体異性体即ち menthol, neomenthol, isomenthol, neoisomenthol の光学異性体の何れかについて分光分析すればよい事になる。著者等は *l*-menthol から誘導されると考えられる *d*-neomenthol, *d*-isomenthol, *d*-neoisomenthol の合成を行つた。*d*-Neomenthol は READ 等⁽⁴⁾の研究に従い *l*-menthol とのエステル化速度の差を利用して次のようにして合成した。

Table 1. Preparation of *d*-Neomenthol

Fig. 1. Spatial configuration of Menthone-Menthol series

(I) *l*-menthol, (II) *d*-neomenthol, (III) *d*-isomenthol, (IV) *d*-neoisomenthol,
(V) *l*-menthone, (VI) menthone enol form, (VII) *d*-isomenthone.

d-Isomenthol 及び *d*-neoisomenthol は従来 *l*-piperitone を還元して得られる *d*-isomenthone を経て合成されているが *l*-piperitone の入手が困難である為、*l*-menthol をこれら異性体に転位させて単離する方法を行った。即ち *d*-isomenthol は *l*-menthone が濃硫酸の作用に依り一部 *d*-isomenthone に転位する現象⁽⁸⁾を利用して、*d*-isomenthone-*l*-menthone 混合物を得。これを menthoneoxime を経て menthylamine-salicylidene として両者を再結により分離し、かくして得られた *d*-isomenthylamine 塩酸塩から *d*-isomenthol を得た。

Table 2. Preparation of *d*-Isomenthol

d-Neoisomenthol については上記の *d*-isomenthone-*l*-menthone 混合物を還元して、4 種の異性体の混合物を得、異性体間のエステル化

Table 3. Preparation of *d*-Neoisomenthol

速度の差を利用して、先ず *l*-menthol, *d*-isomenthol を *p*-nitrobenzoate として除き、残りの *d*-neomenthol と *d*-neoisomenthol は 3,5-dinitrobenzoate として分別結晶法により *d*-neoisomenthol を得た。

以上合成された 3 種の menthol 異性体及び *l*-menthol の融点、旋光度、又その誘導体の融点も従来報告された値と Table 3 の如く、よく一致し、更にそれらの赤外線吸収スペクトルは、再結、再蒸溜等の精製操作を行つても同一の吸収曲線を示し

Table 4. Properties of Menthol-isomers

Menthol	mp.		[α] _D	
	Present	Recorded	Present	Recorded
<i>l</i> -	42~43°	42~43°	-48.3°(alc.)	-49.0°(alc.)
<i>d</i> -neo-	liq.	-22	+17.8 (homo.)	+17.8 (homo.)
<i>d</i> -isc-	84.5~85	83	+27.0 (hexane)	+27.0 (benzene)
<i>d</i> -neoiso-	liq.	-8	+1.0 (homo.)	+0.14(homo.)

Table 5. Melting Point of the Derivatives of Menthol-isomer

Methol	<i>p</i> -nitrobenzoate		3,5 dinitrobenzoate	
	Present	Recorded	Present	Recorded
<i>l</i> -	63.5°	61~62°	154°	153°
<i>d</i> -neo-	96	91~94.5	154	155
<i>d</i> -iso-	56	54	146	145
• <i>d</i> -neoiso-	73	72.5~73	99.5~100	100.5~101

2.88~2.99 μ の吸収は水酸基のものである(固体スペクトルに於ては *l*-menthol 2.99 μ . *d*-isomethol 3.12 μ に移動して結晶状態に於て水素結合に依る会合が行われる事が分る) 更に 3.45 μ , 7.18~7.31 μ の吸収はそれぞれ C-H 結合, イソプロ

分光学的にも純粋である事が確かめられた。

分光分析に於ては Perkin-Elmer 12 B 型赤外線分光分析器を用い, 試料 50 mg を 0.25 cc の二硫化炭素に溶解し液層 0.1 mm の C.H. に入れて 2~15 μ 間の吸収スペクトルを測定した。

2.88~2.99 μ の吸収は水酸

Fig. 2. Infra-red absorption spectrum of Menthol-isomers

ピル基の存在を示し、4~7 μ 間は二硫化炭素の吸収があるので此の図では表われていないが、原液や Nujol に於ては 6.85 μ にメチル基の吸収が見られる。8 μ 以上の領域は指紋曲線と云われ、各異性体特有の曲線を示している。ここに於て 4 吸収曲線共に全く重複しない特性波長はないが、*l*-menthol は 10.88 μ , *d*-neomenthol は 12.26 及び 14.70 μ に、*d*-isomenthol は 10.02 μ , 又 *d*-neoisomenthol は 12.58, 14.45 μ に特有の吸収を有し、しかも比較的相手の吸収が少いのでこれらの波長を Key band と決定した。

Fig. 3. Infra-red absorption spectrum of Menthyl-3,5-dinitrobenzoates

尙実際の分析に於て、menthol 以外に menthone 其の他のテルペン類が試料中に混在し分析を妨害する恐れがあるから、menthol のみをエステルとして分離しこれの赤外線吸収スペクトルを測定する事に依つて menthol 異性体の分析が行えないかと考え、各異性体の 3,5-dinitrobenzoate の赤外線吸収スペクトルを測定した。この場合は各試料を Nujol として液層 0.07 mm の Cell に入れて 7~15 μ 間をとった。

その結果、ニトロ基、ベンゼン環に影響されて、異性体の立体構造的な差異がはつきり表われないらしく吸収曲線は非常に類似して、Key band として使用出来るものはなかった。故に分析に際して、試料中に menthol 以外のテルペン類が混在する場合には、何らかの方法でその混在物質を去除するか、又は menthol を誘導体として分離した後、再び menthol に戻して分析する必要があると考えられる。

実 験

A. *l*-Menthol

市販薄荷脳を石油エーテル (bp. 40~60°) で 5 回再結精製して用いた。mp. 42.5~43.0° [α]_D -48.3° (alcohol).

B. *d*-Neomenthol

READ 等⁽⁴⁾ の合成法に従つて合成した。無色の液体。bp. 83~84°/14 mm, η [α]_D²⁰ +17.80° (Homogenous)

C. *d*-Isomenthol

(1) *l*-Menthone⁽⁹⁾: *l*-Menthol を重クロム酸加里と硫酸で酸化して得た。bp. 70~74°/5 mm, [α]_D¹⁸ -29.47° (Homogenous).

(2) Inverted-menthone⁽⁸⁾: 90%硫酸 100 cc を寒剤中で氷結させ、*l*-menthone 25 g を数回に分けて加え軽く振盪すると硫酸は融けて淡黄色となる。一晚氷室に静置後、湯浴中で 30° まで加温し、氷水中に注加して油分をエーテル抽出、水洗後減圧蒸溜する。これは *l*-menthone と *d*-isomenthone の混合物である。bp. 62~62.5°/5 mm, [α]_D²⁰ +27.43° (Homogenous) (*d*-isomenthone 含有率 46%) 収量 23 g. (92%).

(3) Inverted-menthoneoxime: Inverted-menthone ([α]_D²⁰ +23.55°, *d*-isomenthone content 42.5%) 45.3 g を塩酸ヒドロキシルアミン 27 g, 重曹 40 g, 90%酒精 5.7 g と混合しよく攪拌後 1~2 日間氷室中に静

置, 湯浴中で 35° に加温, 炭酸ガスの発生が終つてから水で稀釈し, エーテル抽出, 減圧蒸溜する. 淡緑色粘稠性の液体で常温では固化しない. bp. $118.5 \sim 122.0^{\circ}/4 \text{ mm}$, $[\alpha]_D^{20} - 4.63^{\circ}(\text{CH}_3\text{OH})$ (*d*-isomenthoneoxime content 43%), 収量 48 g (96.3%).

(4) Inverted-menthylamine : Inverted-menthoneoxime ($[\alpha]_D^{10} - 9.34^{\circ}(\text{CH}_3\text{OH})$ *d*-isomenthoneoxime content 37.5%) 19 g を無水酒精 250 cc に溶解し, 油浴中で沸騰させつつ金属ナトリウム 32.5 g を細片として少量宛加えて還元する. 油浴の温度は $120 \sim 130^{\circ}$. 添加後 2~3 時間加熱して, 水蒸気蒸溜し, 溜出液を塩酸酸性とし, 未反応物をエーテル抽出して除き, 減圧濃縮すれば白色の inverted-menthylamine 塩酸塩を得る. 水又はベンゾールで再結する. $[\alpha]_D^{10} - 16.97^{\circ}(\text{H}_2\text{O})$ (*d*-isomenthylamine-HCl content 32.5%), 収量 20.2 g.

この inverted-menthylamine 塩酸塩 ($[\alpha]_D - 18.3^{\circ}$, *d*-isomenthylamine-HCl content 30.5%) 47.7 g を水に溶かし苛性ソーダ 23 g を加えて menthylamine を遊離させ, エーテル抽出, 減圧蒸溜する. 特有の臭気を有する無色の液体で, 空気中の炭素ガスと容易に白色の附加物を作る. bp. $68^{\circ}/6 \text{ mm}$, $[\alpha]_D^{21} - 20.35^{\circ}$ (Homogenous, *d*-isomenthylamine content 33.5%), $d_4^{21} : 0.86566$ 収量 34.9 g.

(5) *d*-Isomenthylamine-salicylidene : Inverted-menthylamine ($[\alpha]_D^{10} - 1.32^{\circ}$, *d*-isomenthylamine content 59%) 7 g をエーテルに溶かし, salicylaldehyde 7 g を加えると, 黄赤色に变じ水を分離する. 無水硫酸ソーダを加え, 一晚氷室中に静置後エーテルを溜出すれば, 粗結晶を得る. 無水木精で再結を繰返せば純粋の *d*-isomenthylamine-salicylidene を得る. m.p. 122° , $[\alpha]_D^{17} + 76.61^{\circ}(\text{CHCl}_3)$, 収量 3 g.

Analysis Found ; C 78.78, 78.97. H 9.61, 9.70. Calcd. for $\text{C}_{17}\text{H}_{25}\text{ON}$; C 78.75, H 9.63 %.

(6) *d*-Isomenthylamine 塩酸塩 : *d*-Isomenthylamine-salicylidene ($[\alpha]_D^{17} + 76.61^{\circ}$) 12.4 g を濃硫酸 g, 水 70 cc と 1.5 時間煮沸して後, 水蒸気蒸溜して salicylaldehyde を除き, アルカリ性として再び水蒸気蒸溜して溜出して来る *d*-isomenthylamine を塩酸酸性として濃縮すれば, 白色絹糸状の *d*-isomenthylamine 塩酸塩を得る. $[\alpha]_D^{10} + 23.4^{\circ}(\text{H}_2\text{O})$, 収量 8 g.

(7) *d*-Isomenthol : *d*-Isomenthylamine 塩酸塩 ($[\alpha]_D^{10} + 23.4^{\circ}$) 8 g を濃塩酸 11 cc, 水 47 cc に溶解し, 湯浴中で 70° で加温攪拌しつつ 14 cc の水に溶解した亜硝酸ソーダ 3.1 g を滴加する. 反応終了後水蒸気蒸溜して溜出液をエーテル抽出, 乾燥, エーテルを溜去すれば *d*-isomenthol の結晶が析出する. 濾液を減圧蒸溜して *d*-isomenthol と menthene を分離する. 粗 *d*-isomenthol の融点は $78 \sim 79^{\circ}$, 石油エーテルで再結すれば無色針状の純品を得る. mp. $84.5 \sim 85.0^{\circ}$, $[\alpha]_D^{15} + 27^{\circ}(n\text{-Hexane})$, 収量 500 mg. 尚水蒸気蒸溜の残液を濃縮すれば未反応塩酸塩 2.8 g を得た.

D. *d*-Neoisomenthol

(1) Menthol 4 種異性体混合物 : 前記の inverted-menthone ($[\alpha]_D^{15} + 21.77$, *d*-isomenthone 41%) 40.5 g を乾燥イソプロピルアルコール 60 cc と混じ, Al-isopropoxide 1 mol. isopropyl alcohol solution 40 cc を加え Meerwein-Ponndorf の装置で還元する. 油浴の温度は 130° , 反応の進行と共に Al-isopropoxide 溶液を更に 50 cc 宛 2 回加える. 反応終了後, 残液を水蒸気蒸溜しエーテル抽出, 減圧蒸溜する. bp. $91 \sim 98^{\circ}/13 \text{ mm}$, $[\alpha]_D^{15} + 2.86$ (Homogenous) (*d*-isomenthone がこの反応中に *l*-menthone に転化しないと考えれば, *d*-neoisomenthol の含有率は 27.1% となる. 以下これに準ずる). 収量 36 g.

(2) *d*-Neoisomenthol-*d*-neomenthol 混合物 : Menthol 4 種異性体混合物 ($[\alpha]_D + 3.82^{\circ}$, *d*-neoisomenthol content 28.5%) 35 g を乾燥ピリジン 79 cc に溶解し, 水にて冷却, 攪拌しながら計算量の半分の *p*-nitrobenzoylchloride 21 g を添加し, 添加後更に 20 分間攪拌すると異性体の中 *l*-menthol, *d*-isomenthol の殆んど全部が *p*-nitrobenzoate になる. 水で稀釈後エーテル抽出, 水洗してエーテルを溜去して水蒸気蒸溜すれば未反応の *d*-neoisomenthol と *d*-neomenthol が溜出して来る. エーテル抽出して, 減圧蒸溜する. bp. $86 \sim 88^{\circ}/11 \text{ mm}$, $[\alpha]_D + 11.24^{\circ}$ (Homogenous) (*d*-neoisomenthol content 39.3%). 収量 16 g.

(3) *d*-Neoisomenthyl-3,5-dinitrobenzoate : 上記の *d*-neoisomenthol-*d*-neomenthol 混合物 16 g を乾燥ピリジン 48 cc に溶かし 3,5-dinitrobenzoylchloride 28.6 g を一度に加え, よく攪拌後氷室中に一晚静置す

る。水で稀釈後エーテル抽出、水洗してエーテルを溜去すれば黄色の粗エステル 33 g を得る。これをメタノールで分別結晶し、融点 $80\sim 95^\circ$ 及び 100° 以上の部分に分ち、前者を更に再結して白色針状の *d*-neoisomenthyl-3,5-dinitrobenzoate を得る。m. p. $99.5\sim 100.5^\circ$ $[\alpha]_D^{19} -8.9^\circ$ (CHCl_3), 収量 1.9 g. 尚後者を再結すれば *d*-neomenthyl-3,5-dinitrobenzoate, m. p. 154° を得る。

(4) *d*-Neoisomenthol : *d*-Neoisomenthyl-3,5-dinitrobenzoate を 5% KOH-メタノール溶液 15 cc と 30 分間煮沸し、水蒸気蒸溜、エーテル抽出後、減圧蒸溜する。淡い薄荷の匂のする無色の液体である。b. p. $77.5\sim 78.0^\circ/7\text{ mm}$, $[\alpha]_D^{15} : +1.04^\circ$ (Homogenous). 収量 630 mg.

合成した menthol 異性体の *p*-nitrobenzoate. 及び 3,5-dinitrobenzoate の元素分析値は次の如くである。

Carbon and Hydrogen Values obtained.

結 論

天然及び合成薄荷製造工程上

<i>p</i> -Nitrobenzoate			3,5-Dinitrobenzoate			天然及び合成薄荷製造工程上に於ける menthol 異性体を定性定量分析するために <i>l</i> -menthol より <i>d</i> -neomenthol, <i>d</i> -isomenthol, <i>d</i> -neoisomenthol を合成し、この赤外線吸収スペクトルより Key band を求めた。この中 <i>d</i> -isomenthol, <i>d</i> -neoisomenthol は従来の合成法と異り <i>l</i> -menthone の転化により得られた異性体混合物から単離したものである。
Sub. (mg)	C %	H %	Sub. (mg)	C %	H %	
<i>l</i> - $\text{C}_{17}\text{H}_{23}\text{O}_4\text{N}$	66.86	7.59	$\text{C}_{17}\text{H}_{23}\text{O}_6\text{N}_2$	58.27	6.33	天然及び合成薄荷製造工程上に於ける menthol 異性体を定性定量分析するために <i>l</i> -menthol より <i>d</i> -neomenthol, <i>d</i> -isomenthol, <i>d</i> -neoisomenthol を合成し、この赤外線吸収スペクトルより Key band を求めた。この中 <i>d</i> -isomenthol, <i>d</i> -neoisomenthol は従来の合成法と異り <i>l</i> -menthone の転化により得られた異性体混合物から単離したものである。
7.824	66.79	7.53	4.405	58.52	6.25	
<i>d</i> -neo- 4.188	67.21	7.47	4.176	58.31	6.31	天然及び合成薄荷製造工程上に於ける menthol 異性体を定性定量分析するために <i>l</i> -menthol より <i>d</i> -neomenthol, <i>d</i> -isomenthol, <i>d</i> -neoisomenthol を合成し、この赤外線吸収スペクトルより Key band を求めた。この中 <i>d</i> -isomenthol, <i>d</i> -neoisomenthol は従来の合成法と異り <i>l</i> -menthone の転化により得られた異性体混合物から単離したものである。
			3.410	58.50	6.60	
<i>d</i> -iso- 4.360	66.90	7.86	4.782	58.05	6.26	天然及び合成薄荷製造工程上に於ける menthol 異性体を定性定量分析するために <i>l</i> -menthol より <i>d</i> -neomenthol, <i>d</i> -isomenthol, <i>d</i> -neoisomenthol を合成し、この赤外線吸収スペクトルより Key band を求めた。この中 <i>d</i> -isomenthol, <i>d</i> -neoisomenthol は従来の合成法と異り <i>l</i> -menthone の転化により得られた異性体混合物から単離したものである。
4.937	67.16	7.69	4.330	57.95	6.35	
<i>d</i> -neois- 4.284	67.21	7.84	4.521	58.45	6.44	天然及び合成薄荷製造工程上に於ける menthol 異性体を定性定量分析するために <i>l</i> -menthol より <i>d</i> -neomenthol, <i>d</i> -isomenthol, <i>d</i> -neoisomenthol を合成し、この赤外線吸収スペクトルより Key band を求めた。この中 <i>d</i> -isomenthol, <i>d</i> -neoisomenthol は従来の合成法と異り <i>l</i> -menthone の転化により得られた異性体混合物から単離したものである。
3.285	67.27	7.97	4.490	58.49	6.19	

neoisomenthol は従来の合成法と異り *l*-menthone の転化により得られた異性体混合物から単離したものである。

各異性体の Key band は *l*-menthol では 10.88μ , *d*-neomenthol 12.26 , 14.70μ , *d*-isomenthol 13.02μ 又 *d*-neoisomenthol では 12.58 , 14.45μ であった。

尚 menthol 異性体の 3,5-dinitrobenzoate の赤外線吸収スペクトルに於ては適当な Key band はなく、分析に用いられない事が分つた。

本研究の赤外線分光分析は塩野義製薬研究所に於て測定されたもので、同研究所長平山久雄氏及び松井芳樹氏に、又終始指導を賜つた京都大学農学部武居三吉教授、更に有益な助言と批判を得た高野武之助氏並びに信州大学の清水純夫助教授の諸氏に対して茲に深謝の意を表する。尚この研究費の一部は文部省科学研究費交付金によつたものである。

- (1) J. READ *et al.* : *J. Chem. Soc.*, 1779 (1934).
- (2) H. SACHSE : *Ber. deut. chem. Ges.*, 23, 1363 (1890).
- (3) R. B. WOODWARD *et al.* : *J. Amer. Chem. Soc.*, 74, 4223 (1952).
- (4) W. J. GRUBB and J. READ : *J. Soc. Chem. Ind.*, 53, 53 T (1934).

- (5) J. READ *et al.* : *J. Chem. Soc.*, 313 (1934).
- (6) SCHMIDT and SCHULTZ : *Schim. Ber.*, 97 (1934).
- (7) W. HÜCKEL and H. NIGGEMAYER : *Ber. deut. chem. Ges.*, 72, 1354 (1939).
- (8) E. BECKMANN : *Ann.*, 250, 325 (1889).
- (9) *Org. Syntheses.*, IX, 52.

Summary

An attempt has been made to determine the infra-red absorption character of menthol-isomers. Three isomers, i.e. *d*-isomenthol, *d*-isomenthol and *d*-neoisomenthol were synthesized in pure state from natural *l*-menthol, and their infra-red absorption spectrum were studies.

- (1) *l*-Menthol was purified from commercial *l*-menthol by recrystallization.
- (2) *d*-Neomenthol was prepared by READ's method. (Table 1)
- (3) *d*-Isomenthol was synthesized from *l*-menthone and *d*-isomenthone mixture inverted from *l*-menthone. (Table 2)
- (4) *d*-Neoisomenthol was obtained from the mixture of four menthol-isomers by means of the difference of esterification velocity. (Table 3)

Their infra-red absorption spectra gave the singular absorption curves (Fig. 2).

Following key bands were found applicable to analyse the isomers of menthol, 10.88μ for *l*-menthol, 12.26μ and 14.70μ for *d*-neomenthol, 13.02μ for *d*-isomenthol, and 12.58μ and 14.45μ for *d*-neoisomenthol.